Esmeraldin B und andere neue Phenazinderivate aus Streptomyces antibioticus (Tü 2706)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

MATTHIAS BRANDL

aus Oberndorf/Neckar

1987

UNIV.
LIBRARY
IRE

Esmeraldin B und andere neue Phenazinderivate aus Streptomyces antibioticus (Tü 2706)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

MATTHIAS BRANDL

aus Oberndorf/Neckar

1987

Tag der mündlichen Prüfung:	24. September 1987
Dekan:	Prof. Dr. W. Engels
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Winkelmann

Meinen Eltern
und meiner Frau Birgit
gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und die großzügige Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. H. Zähner herzlich.

Herrn Dr. H.-P. Fiedler danke ich für die wertvollen Anregungen bei der Optimierung der HPLC-Analytik und für die Durchführung der Photodioden-Array-Technik.

Bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. W. Keller-Schierlein möchte ich mich recht herzlich für die jahrelange gute Zusammenarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Chem. A. Geiger für die Isolierung der zahlreichen Metabolite und Herrn Dr. U. Bahnmüller für die Synthesen und die Bereitstellung der verschiedenen Phenazinderivate.

Bei Herrn A. Zagst möchte ich mich für die Durchführung zahlreicher Verfütterungsversuche und die Mitarbeit bei verschiedenen Versuchen herzlich bedanken.

Für die sehr kameradschaftliche und offene Atmosphäre in unserer `Laborecke´ danken ich allen.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	8
1.	Chemikalien	8
2.	Nährmedien	9
2.1	Medien für Stammhaltung und Testplatten	9
2.2	S-Puffer für Caenorhabditis elegans	10
2.3	Medium für Tumorzellinien	11
2.4	Produktionsmedien	11
2.5	Resting cell Medien	13
3.	Mikroorganismen	13
3.1	Produzentenstamm	13
3.2	Teststämme	14
4.	Kulturbedingungen	16
4.1	Produktionsstamm	16
4.2	Teststämme	17
4.3	Herstellung einer Sporensuspension	17
4.4	Schüttelkulturen	18
4.5	Resting cell Kulturen	18
4.5.1	Herstellung einer Zellsuspension	18
4.5.2	Verfütterungsversuche	18
4.6	Bestimmung der optimalen Produktionstemperatur	18
4.6.1	Temperaturshift	19
4.7	Fermentationen	19
4.7.1	Fermenterbeschreibung	19
4.7.1.1	Biostat E (10 l Blattrührfermenter)	19
4.7.1.2	20 l und 200 l Umwurffermenter	20
4.7.2	Bestimmung des Luftvolumens	20
4.7.3	Fermentationsparameter	20
4.7.3.1	Batch Fermentationen im Biostat E Fermenter	20
4.7.3.2	Cross Flow Fermentationen im Biostat E Fermenter	21
5.	Fermentationsanalysen	22
5.1	Mycelnaßgewichtsbestimmungen.	22

5.2 Myceltrockengewicht.....22
5.3 Mannitbestimmung.....22
5.4 Phosphatbestimmung.....23
5.5 Stickstoffbestimmung.....23
5.6 Phenazinbestimmung.....23
5.6.1 Mycelaufschluß.....23
5.6.2 Photometrische Detektion der Esmeraldine.....23
5.6.3 Dünnschichtchromatographie.....24
5.6.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).....24
5.6.5 Plattendiffusionstest.....25
6. Physikalisch-chemische Charakterisierung der Phenazine.....25
6.1 UV/VIS-Spektroskopie.....25
6.2 IR-Spektroskopie.....25
7. Biologische Charakterisierung.....26
7.1 Wirkungsspektrum.....26
7.2 Biophotometerversuche.....26
7.3 Test mit Caenorhabditis elegans N2 (in vivo).....27
7.4 Test auf cytostatische Aktivität.....27
8. Screening nach antimetabolit-resistenten Mutanten von TÜ 2706.....28
9. Aufarbeitung und Isolierung.....28
9.1 Mycelextraktion.....28
9.1.1 Mycelextraktion im Rührverfahren.....28
9.1.2 Mycelextraktion im Säulenverfahren.....29
9.2 Petroletherfällung.....29
9.3 Säulenchromatographie.....29
9.3.1 Flash-Chromatographie.....29
9.3.2 Präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie.30
9.3.3 Ausschlußchromatographie mit Sephadex LH 20.....31

III. ERGEBNISSE 33

1. Nachweis der Phenazine.....33
1.1 Dünnschichtchromatographie.....33
1.2 Photometrischer Nachweis der Esmeraldine.....34

1.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie der Phenazine....36
2. Optimierung der Nährlösung....38
2.1 Komplexe Nährlösungen....38
2.1.1 Variation von Nährlösung 19 (Medium13)....39
2.1.2 Variation der Belüftung....40
2.1.3 Temperaturgradient....41
2.2 Resting cell Kulturen und Verfütterungsversuche..42
2.2.1 Suche nach einem geeigneten Resting cell Medium..43
2.2.1.1 Vergleich der Phenazinproduktion in den Medien 19 und 21....43
2.2.2 Variation des verwendeten Resting cell Mediums...43
2.2.3 Verfütterungsversuche....44
2.2.3.1 Verfütterung von aromatischen Metaboliten....44
2.2.3.2 Verfütterung von α-Ketosäuren....47
2.2.3.3 Verfütterung von Metallen....47
2.3 Suche nach antimetabolit-resistenten Mutanten von TÜ 2706....48
2.3.1 Charakterisierung analogresistenter Mutanten von TÜ 2706....49
3. Batch Fermentationen im 10 l Blattrührsystem (Biostat E)....51
3.1 Batch Fermentationen mit Medium 13....51
3.1.1 Verfütterungsversuche bei Fermentationen mit Medium 13....52
3.2 Cross Flow Fermentationen....55
4. Aufarbeitung....57
4.1 Extraktionsverfahren....57
4.2 Säulenchromatographie....58
5. Physikalisch-chemische Charakterisierung....59
5.1 UV/VIS-Spektroskopie....59
5.2 IR-Spektroskopie....61
6. Biologische Charakterisierung....62
6.1 Wirkungsspektrum....62
6.2 Biophotometerversuche....65
6.3 Test gegen Caenorhabditis elegans....66
6.4 Test auf cytostatische Aktivität....68

6.4.1 Vortest auf cytostatische Aktivität.....68
6.4.1.1 Test der aus TÜ 2706 isolierten Phenazine.....68
6.4.1.2 Test der synthetisierten Phenazine.....69
6.4.2 Bestimmung der ID_{50}-Werte.....70
6.4.2.1 Isolierte Phenazine.....70
6.4.2.2 Synthetisierte Phenazine.....71

IV. DISKUSSION 73

1. Isolierung und Nachweis.....73
2. Resting cell Versuche und Biogenese der Phenazine.....75
3. Fermentationen im 10 l Maßstab.....80
4. Wirkungsweise.....83
5. Betrachtung verschiedener Metabolite aus TÜ 2706.....88
6. Ausblicke.....88

V. ZUSAMMENFASSUNG 90

VI. LITERATUR 91

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

α	α bei Wirkungsspektrum = Teststämme auf Minimalmedium
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, USA
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DC	Dünnschichtchromatographie
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen
ention.	entionisiert
ES-B	Esmeraldin B, Esmeraldin A entsprechend
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ID_{50}	Inhibition dosis; Hemmung auf 50 %
IR	Infrarot
MHK	Minimale Hemmkonzentration
N-Quelle	Stickstoffquelle
OD	Optische Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge
P_i	anorganisches Phosphat
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Retentionszeit (min.)
S 1	Substanz 1 isoliert aus TÜ 2706, entsprechend für alle anderen Metabolite
SS	Synthetisierte Substanzen, s.o.
TG	Trockengewicht (g/l)
TÜ	Stammsammlung des Instituts für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Universität Tübingen

I. EINLEITUNG

In einer Zeit, in der der Begriff `Biotechnologie´ zu einem Schlagwort für zahllose Diskussionen, aber auch zu einer Hoffnung für die Lösung von vielen Problemen in unserer Umwelt wurde (z.B. Ernährung der Weltbevölkerung, Abfallbeseitigung, Bekämpfung von Infektionskrankheiten und in zunehmenden Maße von Tumorerkrankungen und AIDS), kommt dem `Screening nach neuen Sekundären Metaboliten aus Mikroorganismen´, einer Teildisziplin der Biotechnologie, besondere Bedeutung zu.

Bei der Suche nach neuen `Sekundären Metaboliten´ werden heute allgemein zwei Wege beschritten.

Mit Hilfe des `Klassischen oder zielgerichteten Screenings´, das schon 1941 von WAKSMAN und WOODRUFF beschrieben wurde, versucht man für ein vorgegebenes Ziel (z.B. bestimmte pathogene Keime oder bestimmte Enzymsysteme) gezielt wirksame Metabolite zu finden (SCHINDLER, 1985). Häufig werden bei dieser Vorgehensweise jedoch schon bekannte und beschriebene Metabolite isoliert (ZÄHNER, 1977). Als Vorteil kann ein großer Durchsatz an Testorganismen und eine zunehmende Automatisierung angesehen werden, wodurch diese Methode vor allem bei industriellen Screening-Programmen breite Anwendung findet.

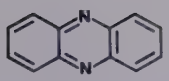
Beim `Shotgun oder nicht zielgerichteten Screening´ (ZÄHNER et al., 1982 und SCHINDLER, 1985) geht man grundsätzlich einen anderen Weg. Man versucht zuerst neue noch nicht beschriebene Metabolite zu finden. Anschließend werden zu diesen neuen Metaboliten biologische Wirkungen oder Anwendungen gesucht. Bei der Suche nach einer biologischen Wirkung zu einer neuen Verbindung ist es notwendig, daß möglichst viele biologische Tests sehr breit (Prokaryonten-Eukaryonten, in vivo-in vitro und an isolierten Enzymsystemen) durchgeführt werden (Zusammenstellung zahlreicher Tests bei STÜMPFEL, 1987). Über den Vergleich mit strukturell ähnlichen Verbindungen (eventuell gleicher Grundkörper) kann häufig ein Einstieg zu teilweise recht interessanten biologischen Aktivitäten gefunden werden. Ein Vorteil dieser Screeningmethode ist, daß das

Verhältnis von unbekannten zu bekannten Verbindungen deutlich besser ist, wie beim zielgerichteten Screening (ZÄHNER, 1977).
Für die 1983 in einem `Chemischen Screening´ (ZÄHNER et al., 1982) gefundenen und beschriebenen Esmeraldine aus Streptomyces antibioticus (TÜ 2706) (BRANDL, 1985) konnte bislang keine strukturelle Zugehörigkeit zu einer Verwandtschaftsgruppe und auch keine biologische Wirkung gefunden werden. Im Laufe der vorliegenden Arbeit konnte aus dem Mycelextrakt von TÜ 2706 der Phenazingrundkörper (= Phenazin), ein Strukturelement der Esmeraldine, isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt werden (GEIGER, 1985).

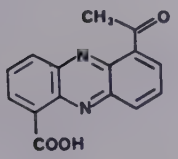
Die Bearbeitung von Metaboliten aus der Gruppe der Phenazine begann mit der Beschreibung der Pyocyanine bei Pseudomonas pyocyanea (WREDE & STRACK, 1929). Phenazine sind meist intensiv gelb oder rot gefärbte Verbindungen (MAC DONALD, 1967). Pseudomonaden zeigen bei der Produktion von Phenazinen eine große Variabilität, so sind in der Literatur zahlreiche Phenazinderivate beschrieben (GERBER (1966), (1969), (1973), CHANG & BLACKWOOD (1969) und RÖMER et al., (1979)). Die Fähigkeit zur Bildung von Phenazinen scheint jedoch nicht nur auf Pseudomonaden begrenzt zu sein. Verschiedene Autoren beschreiben die Bildung von Phenazinen bei Streptomyceten und anderen Mikroorganismen (NAKAMURA et al. (1957), CHANG & BLACKWOOD (1969), INGRAM & BLACKWOOD (1970), MESSENGER & TURNER (1983)).

Nachdem aus TÜ 2706 der Phenazingrundkörper (vgl. Abb. 1, S 1) isoliert werden konnte und die dazugehörigen physikalisch-chemischen Parameter (UV/VIS-, IR-, NMR- und MS-Spektren) zugänglich waren, konnten aus dem Mycelextrakt von TÜ 2706 zahlreiche weitere Phenazinderivate isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Einen Überblick gibt die Abbildung 1, bei der alle isolierten Metabolite aufgelistet sind. Bislang noch nicht beschriebene Derivate sind markiert. Meist handelt es sich um Ester der Saphensäure.

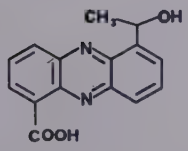
Die Kenntnis der zahlreichen verschiedenen Phenazinderivate (Abb. 1, S 1-S 11) und die von Zähner (1982) formulierte These, daß es sich bei dem von Streptomyceten durchgeführten Sekundärstoffwechsel meist um die Variation eines Themas handelt, führten zu der



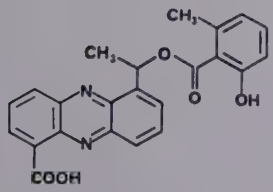
S 1 (Phenazin)



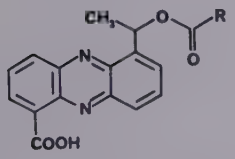
S 2* (6-Acetyl-Phenazin-
1-Carbonsäure)



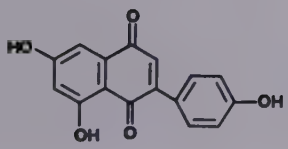
S 3 (Saphensäure)



S 6 (Saphenamycin)

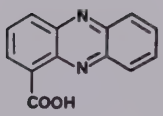


S 7* (R siehe Esmeraldin A)

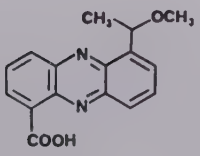


S 8 (Genistein = kein Phenazin)

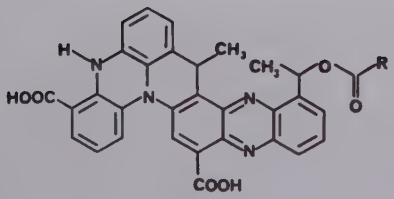
Abbildung 1: Aus TÜ 2706 isolierte Verbindungen.
(*: neue, noch nicht beschriebene Phenazine)



S 9 (Phenazin-1-Carbonsäure)



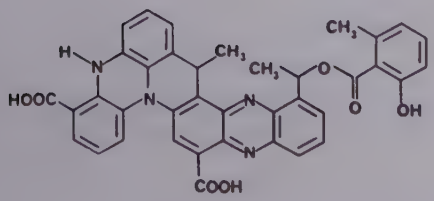
S 11*(Saphensäuremethylether)



Esmeraldin A *

R= A: 12-Methyltridecansäure
B: Tetradecansäure
C: 12-Methyltetradecansäure
D: 14-Methylpentadecansäure
E: Hexadecansäure
F: 14-Methylhexadecansäure
G: C-19 H-36 O-2 unges. Fettsäure
H: 16-Methylheptadecansäure

(Esmeraldin A ist ein heterogenes Gemisch mit den angeführten Fettsäuren A-H)



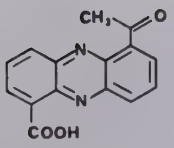
Esmeraldin B *

Abbildung 1: Aus TÜ 2706 isolierte Verbindungen (Fortsetzung).

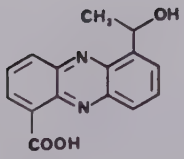
Annahme, daß die bislang unbekannten Esmeraldine mit großer Wahrscheinlichkeit auch Phenazinderivate sein müßten. Mit dem Abschluß der experimentellen Versuche zu dieser Arbeit konnten auch die beiden Metabolite Esmeraldin A und B als Phenazinderivate aufgeklärt werden (GEIGER & KELLER-SCHIERLEIN, 1987).
Bei den bisher bekannten Phenazinen konnten zahlreiche biologische Aktivitäten nachgewiesen werden. So sind Aktivitäten gegen Mikroorganismen (TIPTON & RINEHART (1970), PATEL et al. (1984), GURUSIDDAIAH et al. (1986)), gegen Tumorzellinien (KITAHARA et al. (1982), ASANO et al. (1986), BIGGE et al. (1986) und SMITKA et al. (1986)) und die Wirkung auf Enzyme (UMEZAWA et al. (1980), BUSH et al. (1984), LIU (1984) und MILLER et al. (1987)) bekannt.
Häufig führen Substitutionen oder Derivatisierungen am Phenazingrundkörper zu recht unterschiedlichen biologischen Wirkungen, wie die obigen Beispiele für biologische Aktivitäten der Phenazine zeigen.

Mit der aus TÜ 2706 isolierten Saphensäure (S 3) hatte man einen Grundkörper gefunden, der sehr vielfältig variiert werden konnte. Es wurde deshalb versucht, diese Saphensäure synthetisch herzustellen und gezielt zu modifizieren (BAHNMÜLLER, 1987). Abbildung 2 zeigt die synthetisierten Derivate der Saphensäure.

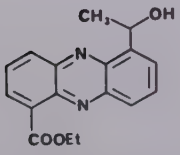
Mit der vorliegenden Arbeit sollte die in der Diplomarbeit (BRANDL, 1985) begonnene Optimierung der Analytik und Fermentation, sowie die Isolierung der Esmeraldine aus TÜ 2706 weitergeführt werden. Für die Strukturaufklärung und für Versuche zur Wirkungsweise dieser Metabolite sollte genügend Material zur Verfügung gestellt werden. Weitere Schwerpunkte waren Versuche zur Biogenese und Struktur/Wirkungsbeziehung, der im Laufe der Arbeit isolierten und in ihrer Struktur aufgeklärten Phenazine. Zusätzlich sollten die von BAHNMÜLLER (1987) synthetisierten Phenazinderivate für diese Studien herangezogen werden.



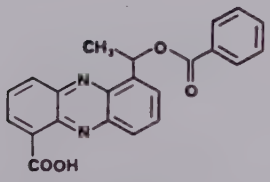
SS 3 (≙ S 2)



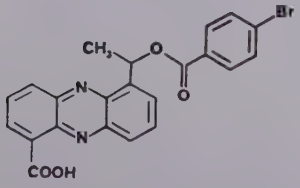
SS 4 (≙ S 3)



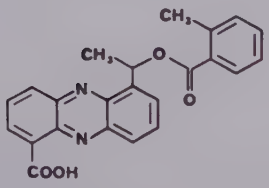
SS 4 Ethylester



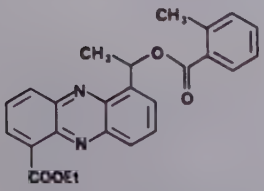
SS 4 Benzoat



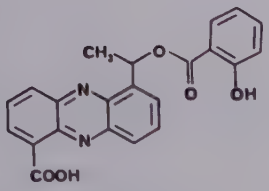
SS 4 p-Brom-Benzoat



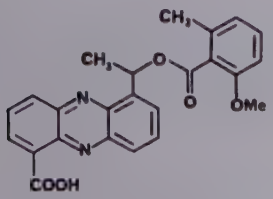
SS 4 Toluylat



SS 4 Toluylat-Ethylester

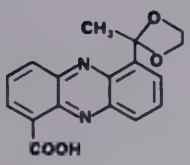


SS 4 Salicylat

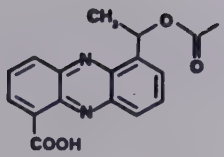


SS 4 6-Methylsalicylsäure-Methylether

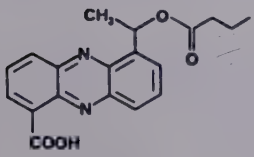
Abbildung 2: Synthetisierte Phenazine. (BAHNMÜLLER, 1987)



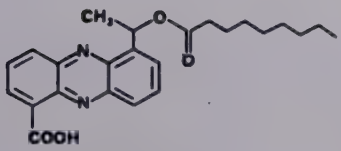
SS 2



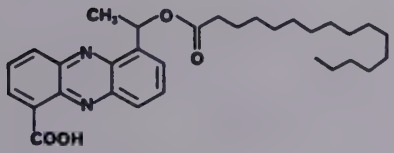
S 3 Acetat



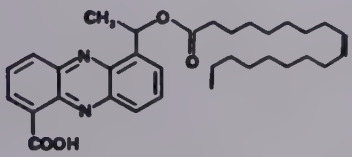
SS 4 Butyrat



SS 4 Caprylat



SS 4 Palmitat



SS 4 Oleat

SS 4 Cap I: ohne Strukturangabe

Esmeraldin A Methylderivat: Struktur vgl. Esmeraldin A, Ort der Methylierung nicht bekannt.

Abbildung 2: Synthetisierte Phenazine (Fortsetzung).

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt verwendet.

Aldrich Chemistry Company, USA	m-Fluor-Phenylalanin
Bayer AG, Leverkusen	Corn steep liquor
BP-Chemicals, Düsseldorf	Polyol PPG 2025
Carroux H., Hamburg	Komplexagar
Ciba-Geigy, Basel, Schweiz	Fleischmehl
Degussa AG, Hanau	Cyclopropylglyoxylsäureamid, Phenyl-, Furylglyoxylsäure, Trimethylpyruvat
Deutsche Maizenawerke, Hamburg	Glukose (Dextrose^{R}m), Hafermehl, D-Mannit, Cerelose
Difco Laboratories, Detroit, USA	Bacto-Agar
EGA-Chemie, Steinheim	m-Fluor-DL-Tyrosin, 6-Fluor-DL-Tryptophan
Fischer GmbH, Böblingen	Rapsschrot
Fluka AG, Buchs, Schweiz	Anthranilsäure, 2-Fluor-DL-Phenylalanin
Hedinger, Stuttgart	Hyphlo Supercel (Celit)
J.T. Baker Chemicals Co., Philipsburg	Sand und Silicagel für die Flashchromatographie
Oxoid Deutschland, Wesel	Hefe- und Malzextrakt
Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden	Sephadex LH 20
Roth KG, Karlsruhe	Stärke, Glycerin (98%, technisch)
Schoenenberger, Magstadt	Sojamehl (vollfett)
Serva Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg	MES, Tween 80

Sigma Chemie GmbH, München	5-Fluor-DL-Tryptophan, ß-(2-Thienyl)-DL-Alanin
Strothman, Minden	Distillers soluble

2. Nährmedien

Alle Nährmedien wurden nach dem Einstellen des pH-Wertes für 20 Minuten bei 121°C im Autoklaven sterilisiert.

2.1 Medien für Stammhaltung und Testplatten

Medium 1
Hefe-Malz-Agar (HA)

Hefeextrakt:	4 g
Malzextrakt	10 g
Glukose	4 g
Komplexagar	20 g
Leitungwasser	1 l
pH 7,3	

Medium 2
Malz-Agar (MA)

Malzextrakt	20 g
Komplexagar	20 g
Leitungswasser	1 l
pH 7,3	

Medium 3
Minimalmedium (DM)

K_2HPO_4	7 g
KH_2PO_4	3 g
$(NH_4)_2SO_4$	1 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,1 g
NaCl	0,1 g
Glukose*	4 g
Bacto-Agar	20 g
ention. Wasser	1 l
pH 7,3	

Medium 4
Definiertes Medium 130

Glukose*	8 g
Ammoniumtartrat	4 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	2 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	1 g
$CaCl_2$	0,2 g
$MnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,01 g
Ferrioxamin	0,02 g
Bacto-Agar	20 g
ention. Wasser	1 l
pH 7,3	

Medium 5
TIC-Medium
(KNIPPERS, 1966)

Medium 6
Nutrient Broth (NB)

Nutrient Broth	8 g
Komplexagar	20 g
Leitungswasser	1 l
pH 7,3	

Medium 7
Clostridium-Medium (Cl)

Fleischextrakt	3 g
Hefeextrakt	3 g
Malzextrakt	3 g
Pepton	3 g
Ascorbinsäure	0,2 g
Glukose*	5 g
Komplexagar	20 g
pH 7,0	

Medium 8
Hafermehl-Agar (OM)

Hafermehl	20 g
Komplexagar	20 g
Leitungswasser	1 l
pH 7,3	

Medium 9
HOPWOOD et al.(1985)

Asparagin	0,5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,2 g
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	10 mg
Glukose*	10 g
Bacto-Agar	20 g
pH 7,2	

2.2 S-Puffer für Caenorhabditis elegans N2

Medium 10
S-Puffer (0,05 M Kalium-Phosphatpuffer)

0,05 M K_2HPO_4 + 0,05 M KH_2PO_4 auf pH 6 eingestellt
0,1 M NaCl

2.3 Medium für Tumorzellinien

Medium 11

RPMI 1640-Medium

nach MOORE et al. (1967)
+ 10 % foetales Kälberserum
+ Gentamycin (100 µg/ml)
+ Amphotericin (2,5 µg/ml)

2.4 Produktionsmedien

Medium 12

Nährlösung 19

Mannit	20 g
Sojamehl	20 g
Leitungswasser	1 l

pH 7,5

Medium 13

Nährlösung 19 verändert

Mannit	50 g
Sojamehl	20 g
Leitungswasser	1 l

pH 7,5

Medium 14

PD 116,152 (verändert)
TUNAC et al. (1986)

Maltose	25 g
Distillers sol.	5 g
Hefeextrakt	2 g
NaCl	1 g
$CaCO_3$	2,5 g
Leitungswasser	1 l

pH 7,5

Medium 15

1,6 Dh-2 chl.ph. (verändert)
PATEL et al. (1984)

Hefeextrakt	5 g
Cerelose	5 g
Dextrin	30 g
Corn steep liquor	10 ml
$CaCl_2$	0,24 g
Leitungswasser	1 l

pH 7,3

Medium 16

Saph 1 (verändert)
KITAHARA et al. (1982)

Glycerin	15 g
Lösl. Stärke	15 g
Sojamehl	5 g
$CaCO_3$	2 g
Leitungswasser	1 l
pH 7,4	

Medium 17

Saph 2 (verändert)
KITAHARA et al. (1982)

Glycerin	15 g
Lösl. Stärke	15 g
Sojamehl	5 g
$CaCO_3$	2 g
Rapsschrot	15 g
Leitungswasser	1 l
pH 7,4	

Medium 18

Minimalmedium I (verändert nach FRITSCHE, 1968)

KH_2PO_4	2,2 g
$Na_2HPO_4 \times 7\ H_2O$	6 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,2 g
NaCl	0,2 g
$Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$	0,02 g
Asparagin x 1 H_2O	2 g
Glukose*	10 g
Spurenelementlsg.	10 ml
Thiaminlösung	10 ml
ention. Wasser	1 l

Spurenelementlösung:

H_3BO_3	50 mg
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	4 mg
KJ	10 mg
$FeCl_3 \times 6\ H_2O$	20 mg
$MnSO_4 \times 1\ H_2O$	40 mg
$ZnSO_5 \times 7\ H_2O$	40 mg
Ammoniumheptamolybdat	20 mg
Biotin	10 mg
ention. Wasser	1 l

Thiaminlösung:

Thiaminhydrochlorid	10 mg
ention. Wasser	1 l

*: getrennt sterilisieren

2.5 Resting cell Medien

Medium 19
Nährlösung IV

$MgSO_4$	1 g
$CaCl_2$	0,5 g
K_2HPO_4	1 g
Asparagin	5 g
D-Glukose	20 g
meso-Inosit	100 mg
Biotin	1 mg
ention. Wasser	1 l
pH 7,5	

Medium 20
Nährlösung IV (Mannit) verändert

$MgSO_4$	1 g
$CaCl_2$	0,5 g
K_2HPO_4	1 g
Asparagin	5 g
Mannit	20 g
meso-Inosit	100 mg
ention. Wasser	1 l
pH 7,5	

Medium 21
DELZER (1983)

Mannit	20 g
Asparagin	0,16 g
MES	50 mM
Spurenelemente	
ention. Wasser	1 l
pH 7,0	

Spurenelemente für Medium 21:

KCl	0,1 g
$CaCl_2$	0,1 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,1 g
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,01 g
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	0,02 g
$MnSO_4 \times 1\ H_2O$	30 µg

3. Mikroorganismen

3.1 Produzentenstamm

Streptomyces antibioticus (TÜ 2706) stammte aus einer Bodenprobe aus Tansania. Er wurde im Großpraktikum 1983/84 nach HÜTTER (1967) bestimmt. Eine Bestimmung der Subspezies nach NONOMURA (1974) war nicht möglich.

3.2 Teststämme

Alle verwendeten Teststämme stammten aus der Stammsammlung der Lehrstühle Mikrobiologie I und Genetik (Arbeitskreis Prof.E.M. Sander) des Instituts für Biologie II der Universität Tübingen.

Organismus	Temperatur (°C)	Medium	Test
1. EUBAKTERIALES, Gram-positiv			
Arthrobacter aurescens (Clark) Phillips, ATCC 13344	27	NB	Ü
Bacillus brevis Migula, ATCC 9999	37	DM	Ü
Bacillus cereus Frankland & Frankland, ATCC 6464	37	DM	Ü
Bacillus subtilis Ehrenberg (Cohn), ATCC 6051, TÜ 203	37	DM,Ox	Ü
Brevibacterium flavum (Okumura) Ajinomoto ATCC 14067	37	Ox	Ü
Clostridium pasteurianum Winogradsky, ATCC 6013	27	Cl	SA
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032	27	Ox	Ü
Corynebacterium rathayi Dowsen ATCC 13659	27	Ox	Ü
Micrococcus luteus (Schroeter) Cohn, ATCC 381	27	NB	Ü
Sarcina lutea Schroeter	37	NB	Ü
Staphylococcus aureus Rosenbach, TÜ 202	37	Ox	Ü
Staphylococcus aureus cowan	37	Ox	Ü
2. EUBAKTERIALES, Gram-negativ			
Achromobacter geminianii Ravenel, Inst.f. Mikrobiologie, Göttingen	37	NB	Ü
Agrobacterium tumefaciens Smith & Townsend, ATCC 15955	27	NB	Ü

Erwinia carotovora DSM 30168	27	DM	Ü
Erwinia atroseptica DSM 30186	27	NB	Ü
Escherichia coli K 12 (Migula) Castellani & Chalmers	37	DM,NB	Ü
Proteus mirabilis Hauser, ATCC 29906	37	NB	Ü
Proteus vulgaris Hauser, ATCC 13315	37	NB	Ü
Vibrio	37	NB	Ü
Xanthomonas campestris	27	TIC	Ü
Xanthomonas pelargonii	27	TIC	Ü
3. PSEUDOMONALES			
Pseudomonas fluorescens Migula, ATCC 13525	37	NB	Ü
Pseudomonas syringae	37	TIC	Ü
4. ACTINOMYCETALES			
Streptomyces glaucescens (Preobrazhenskaya) Pridham et al. TÜ 49	27	HA	Ü
Streptomyces violaceoruber (Waksman & Curtis) Pridham TÜ 22	27	HA	Ü
Streptoymces viridochromogenes, Waksman & Henrici TÜ 57	37	HA	Ü
5. OOMYCETES			
Pythium debarianum Hesse TÜ 293 CBS 114.19	22	OM	RK
Saprolegnia asterophora de Bary, TÜ 543	24	HA	Ü
6. ZYGOMYCETES			
Mucor hiemalis +/- Wehmer TÜ 179/180	27	HA	S
Mucor miehei Cooney & Emerson TÜ 284	37	HA	S
7. ASCOMYCETES			
Paecilomyces variotii Bainier TÜ 137	37	HA	S
Sordaria macrospora TÜ 128	27	HA	S

8. DEUTEROMYCETES			
Alternaria kikuchiana Tanaka TÜ 169	27	MA	S
Arthrinium phaeosporum TÜ 159	27	HA	S
Aspergillus fumigatus Fresenius TÜ 149	37	HA	S
Aspergillus niger van Tiegham TÜ 503	37	HA	S
Botrytis cinerea Persoon & Fries TÜ 157	24	HA	RK
Candida albicans (Robin) Berkhout TÜ 565	37	HA	Ü
Candida guilliermondii Lang TÜ 8053	27	HA	Ü
Chaetomium globosum TÜ 138	27	HA	Ü
Fusarium solani, TÜ 8014	27	HA	Ü
Hansenula anomala (Hansen) Sydow TÜ 279	27	HA	Ü
Microsporum gypseum TÜ 282	27	HA	Ü
Pichia farinosa Hansen TÜ 291	27	HA	Ü
Saccharomyces cerevisiae Hansen TÜ 125	27	HA	Ü
Saccharomyces lipolytica Yarrow, TÜ 8097	27	HA	Ü
Schizosaccharomyces pombe Lindner, TÜ 251	27	HA	Ü
Trichophyton mentagrophytes TÜ 510	27	HA	S
9. BASIDIOMYCETES			
Rhizoctonia solani Kuehn, TÜ 174	27	HA	Ü
Rhodotorula rubra Lodder, TÜ 8093	37	HA	Ü

Ü: Übernachtkultur
S: Sporensuspension
RK: Test an Riesenkolonie
SA: nach SANTO (1976)

4. Kulturbedingungen

4.1 Produktionsstamm

Der Stamm TÜ 2706 wurde auf Schrägagarröhrchen mit Medium 1 überimpft, bei 27°C bis zur Sporulation inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

4.2 Teststämme

S: von gut sporulierten Teststämmen wurden die Sporen mit 5 ml wässriger Natriumlaurylsulfatlösung (100 mg/ml) vom Schrägagarröhrchen abgeschwemmt und zu 200 ml des entsprechenden Agars gegeben.

Ü: Vegetative Zellen einer Übernachtkultur wurden mit dem entsprechenden Medium auf eine OD_{578} = 1 eingestellt. Hiervon wurde dann 1 ml mit 200 ml Agar vermischt.

RK: Mycelstücke nicht sporulierender Pilze wurden mit einem Korkbohrer (ø 6 mm) ausgestochen, auf Platten mit Medium 1 gelegt und inkubiert, bis der Koloniedurchmesser etwa bei 20 mm war. Die Testrondellen wurden dicht an den Wachstumsrand dieser Riesenkolonien gelegt. Ausgemessen wurde nach einer entsprechenden Inkubationszeit die Wachstumshemmung um die Filterrondelle. Der Test an der Riesenkolonie ist bei HÜTTER et al. (1965) beschrieben

SA: Herstellung der Testplatten und Durchführung des Tests erfolgte nach SANTO (1976).

4.3 Herstellung einer Sporensuspension

Zu gut sporulierten Schrägagarröhrchen mit Medium 1 wurden 1,5 ml tweenhaltige Saline (1 Tropfen Tween/100 ml) gegeben und die Sporen mit einer Impföse abgeschert. Um die Sporenketten zu zerschlagen und vom Substratmycel zu trennen, wurde die so erhaltene Suspension ca. 30 min. ins Ultraschallwasserbad gestellt und anschließend über Glaswolle abfiltriert. Die Titerbestimmung erfolgte durch Auszählen der Zellen in der Zählkammer, die Bestimmung der Lebendkeimzahl nach Verdünnung in Saline und Ausstrich verschiedener Verdünnungsstufen auf Platten mit Medium 1.

4.4 Schüttelkulturen

Bei allen Schüttelkolbenversuchen wurden, wenn nicht anders angegeben, 500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich verwendet. Sie enthielten 100 ml Füllmenge und wurden mit Sporen vom Schrägagarröhrchen angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 27°C und 120 rpm auf der rotierenden Schüttelmaschine (RC 106, Infors AG, Basel, Schweiz).

4.5 Resting cell Kulturen

4.5.1 Herstellung einer Zellsuspension

96 h alte Vorkulturen von Tü 2706 in Medium 13 wurden vereinigt und in der Sorvallzentrifuge (6000 rpm, 20 min., GS3-Rotor) abzentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit kalter Saline gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Sediment resuspendiert und mit Saline so aufgefüllt, daß man eine Zellsuspension von 60 ml Zellsuspension/100 ml Vorkultur erhielt.
20 ml dieser Zellsuspension wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich und 80 ml Resting cell Medium 20 bis zu einem Endvolumen von 100 ml gegeben.
Die Inkubation erfolgte wie unter II.4.4 beschrieben.

4.5.2 Verfütterungsversuche

Alle im Resting cell Verfahren, aber auch bei Fermentationen in komplexen Medien, verfütterten Vorstufen oder Effektoren wurden aus 0,1 M Stammlösungen mit pH 7,0-7,3 zugegeben.

4.6 Bestimmung der optimalen Produktionstemperatur

Zur Bestimmung der optimalen Produktionstemperatur der Phenazine und Esmeraldine wurde der Temperature Gradient Incubator, Modell

TN-3, Toyo Kagaku Sangyo Co. Ltd., Tokyo, Japan verwendet. Der Temperaturbereich wurde zwischen 17°C und 38°C gewählt. In rechtwinklig gebogenen Reagenzgläschen befanden sich 10 ml Medium 13, die mit 1 ml einer 48 h alten Vorkultur angeimpft wurden. Als Schüttelstufe wurde die Stufe 2.5 gewählt.

4.6.1 Temperaturshift

Schüttelkulturen wurden bis zur stationären Phase (72-96 h) angezogen und anschließend vereinigt. Rechtwinklig gebogene Reagenzgläschen (siehe II.4.6) wurden mit je 11 ml dieser Vorkultur gefüllt und entsprechend II.4.6 auf dem Temperature Incubator inkubiert.

Bei beiden Temperaturgradienten (II.4.6 und II.4.6.1) wurden zu verschiedenen Inkubationszeiten aus jedem Gläschen je 1 ml Probe gezogen. Die Proben wurden entsprechend II.5.6 aufgearbeitet und mit verschiedenen Methoden analysiert.

4.7 Fermentationen

4.7.1 Fermenterbeschreibung

4.7.1.1 Biostat E (10 l Blattrührfermenter)

Alle 10 l Fermentationen wurden in 10 l Blattrührfermentern vom Typ Biostat E, der Firma Braun Melsungen AG, Melsungen, durchgeführt. Zur technischen Grundausstattung gehörten:

- Drehzahlregulierung
- Temperaturregelung mit Thermofühler PT 100
- pH-Messung mittels sterilisierbarer pH-Elektrode (Typ 465-VT, Firma Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz)
- pO_2-Messung mit einer sterilisierbaren Sauerstoff-Elektrode, (Typ IL 531, Firma Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz)

Die Regelung von Temperatur und Drehzahl, sowie die Aufzeichnung und Speicherung der Meßdaten von Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff-

partialdruck und Drehzahl wurde über einen Personal Computer (Typ Victor VPC 15, Victor Technologies GmbH, Frankfurt) und dem Software System BRC 1000 der IMA-GmbH (Institut für Molekulare Analytik, Dreieich) durchgeführt. Auf eine Regelung des pH-Wertes und des Sauerstoffpartialdruckes (pO_2) konnte verzichtet werden.

4.7.1.2 20 l und 200 l Umwurffermenter

Alle im 20 l und 200 l Maßstab durchgeführten Fermentationen wurden in Umwurffermentern der Firma Giovanola Frères SA., Monthey, Schweiz durchgeführt. Die technische Ausstattung entsprach bis auf die Steuerung den Biostat E Fermentern. Diese Fermentationen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht näher beschrieben, es sollte jedoch erwähnt werden, daß derartige Fermentationen durchgeführt wurden und daß das `scale up´ bis zum 200 l Maßstab möglich war.

4.7.2 Bestimmung des Luftvolumens

Mit einem Laborgasmesser (Typ L 5-PVC) der Firma Wohlgroth & Co., Zürich, Schweiz wurde die Luftmenge, die während der Fermentationszeit den Fermenter durchströmte, gemessen und eingestellt.

4.7.3 Fermentationsparameter

4.7.3.1 Batch Fermentationen im Biostat E Fermenter

Den mit 9 l Medium 13 gefüllten Fermentern wurden vor dem Sterilisieren 2 ml Polyol als Schaumbekämpfungsmittel zugesetzt. Nach der Sterilisation und dem Erreichen der Betriebstemperatur wurden die Fermenter mit 1 l einer 48 h alten Schüttelkultur angeimpft.

Fermentationsparameter:

Belüftung:	0,6 vvm
Drehzahl:	260 rpm
Temperatur:	27°C bzw. Temperaturshift von 27°C auf 22°C
pH-Wert:	7,5 (eingestellt vor dem Autoklavieren)
Fermentationsdauer:	168 h

4.7.3.2 Cross Flow Fermentationen im Biostat E Fermenter

Bei den im 10 l Maßstab durchgeführten Cross Flow Fermentationen wurden die Fermenter wie unter II.4.7.3.1. beschrieben, vorbereitet und angeimpft. Nach 96 h wurde mittels einer sterilisierten Cross Flow Apparatur (Typ ceraflo™, Norton Company, Worcester, England) ein Teil der komplexen Nährlösung 13 entfernt und durch das synthetische Medium 20 ersetzt.

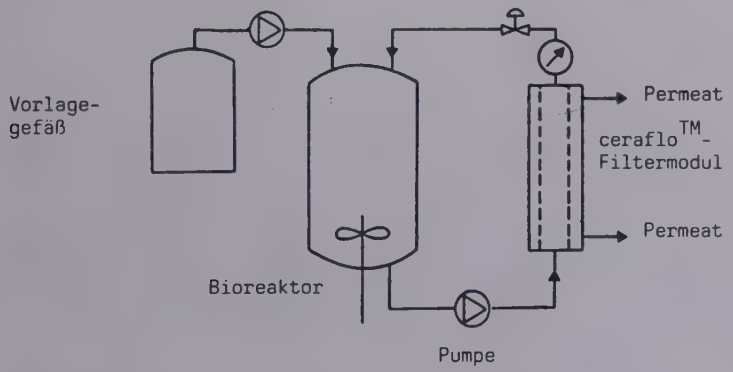


Abbildung 3: Schematischer Aufbau beim Cross Flow Verfahren.

Parameter für das Cross Flow Verfahren:

Pumpenfluß:	Einstellung 65
Druck:	1 kg/cm²
Dauer:	225 min.
entfernte Mediummenge:	5 l
zugegebene Mediummenge:	7 l
Fermentationsdauer:	170 h

(Pumpe: Watson Marlow, Typ 603 U)

Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Proben entnommen, um anhand der Trockengewichts- und Viskositätsbestimmung (vgl. REUSCHENBACH, 1986a) das Aufkonzentrieren der Kultur verfolgen zu können.

5. Fermentationsanalysen

5.1 Mycelnaßgewichtsbestimmung

5 ml Probe wurden in einem Zentrifugenglas mit einer Minifuge (Heraeus Christ GmbH, Osterode) abzentrifugiert (5000 rpm, 20 min.). Nach dem Dekantieren des klaren Überstandes wurde das Mycelnaßgewicht durch Differenzwägung mit dem Leergewicht des Zentrifugenglases bestimmt.

5.2 Myceltrockengewicht

Reaktionsgefäße (Typ 2101, Füllmenge 1,5 ml, Sarstedt) wurden über Nacht bei 120°C getrocknet und eine Stunde bei Raumtemperatur zum Temperaturausgleich aufbewahrt. Anschließend wurde das Leergewicht bestimmt. Jeweils 1 ml Probe wurde in diese Reaktionsgefäße pipettiert und in der Biofuge A (Heraeus Christ GmbH, Osterode) abzentrifugiert (14926 g, 10 min.). Nachdem der Überstand abgenommen worden war, wurden die Reaktionsgefäße bei 120°C im Trockenschrank über Nacht getrocknet.
Nach Temperaturausgleich bei Raumtemperatur ergab die Differenzwägung mit dem Leergewicht das Myceltrockengewicht.

5.3 Mannitbestimmung

Die Bestimmung der im Kulturfiltrat gelösten Mannitmenge erfolgte wie bei REUSCHENBACH (1986b) beschrieben.

5.4 Phosphatbestimmung

Die Phosphatbestimmung erfolgte mit dem Phosphat-Testkit der Firma Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen.

5.5 Stickstoffbestimmung

Die Bestimmung der Ammonium-Ionen erfolgte nach der bei FAWCETT & SCOTT (1960) beschriebenen Methode. Bei diesem Test entsteht durch Ammonium in Gegenwart von Phenol-Nitroprussid und alkalischer Hypochlorid-Lösung ein blauer Indophenolfarbstoff. Der Test ermöglichte die Bestimmung der Ammonium-Ionen im Kulturfiltrat.

5.6 Phenazinbestimmung

5.6.1 Mycelaufschluß

Die von TÜ 2706 produzierten Phenazine mußten aus dem Mycel isoliert werden. Es wurden hierzu jeweils 1,4 ml Kultur in Reaktionsgefäße (Typ 2101) pipettiert. Nach dem Abzentrifugieren (14926 g, 10 min., Biofuge A, Firma Heraeus Christ GmbH, Osterode) wurde der klare Überstand (= Kulturfiltrat) entfernt und für weitere Analysen aufbewahrt. Dem abzentrifugierten Mycel wurden 0,7 ml MeOH zugegeben und der ganze Ansatz für 20 min. ins Ultraschallwasserbad gestellt. Anschließend wurde abzentrifugiert. Der so gewonnene Überstand (= Mycelrohextrakt) wurde für Phenazinbestimmungen eingesetzt.

5.6.2 Photometrische Detektion der Esmeraldine

Die nach II.5.6.1 erhaltenen Mycelrohextrakte wurden mit einem Eppendorfphotometer 1101 M bei 623 nm auf ihren Gehalt an Esmeraldinen untersucht. Mit Reinsubstanzen von Esmeraldin A und B konnten Eichkurven erstellt werden.

5.6.3 Dünnschichtchromatographie

Für die dünnschichtchromatographische Detektion der Esmeraldine und Phenazine wurde die Dünnschichtchromatographie nach STAHL (1967) auf Kieselgel 60 F_{254} DC-Alufolien durchgeführt. Zum Einsatz kamen folgende Laufmittelsysteme.

1. $CHCl_3$: MeOH (9:1)

2. Aceton : n-Hexan (10:4)

Die Detektion war im VIS- und im UV-Bereich (254 und 366 nm) möglich.

5.6.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für eine Vielzahl der in dieser Arbeit beschriebenen Metabolite aus dem Phenazinstoffwechsel von TÜ 2706 konnte eine HPLC-Analytik entwickelt werden.

Geräteausstattung:

Pumpen:	zwei HPLC-Pumpen (Typ 6400,Firma Knauer,Bad Homburg)
Detektion:	Spektralphotometer mit variabler Wellenlänge (Typ 8700, Firma Knauer, Bad Homburg)
Autosampler:	Autosampler Typ MSI 660 (Kontron GmbH, München) Probenschlaufe 20 µl
Integrator:	HP 3360 (Hewlett-Packard, Waldbronn)

Die Steuerung und Regelung der Pumpen wurde mit einem Apple IIc Personal Computer und der Software Chromatochart (Firma Heyden & Son LTD. Datasystems, Rheine) vorgenommen.

Trennparameter:

Säule:	Shandon ODS Hypersil 5 µm Länge 12,5 cm, I.D. 0,46 cm (Firma Grom, Ammerbuch)
Vorsäule:	Shandon ODS Hypersil 5 µm, Länge 2 cm
Detektion:	254 nm

Eluent: Gradienten-Elution

Zeit (min.)	Mobile Phase A (%)	B (%)
0	90	10
8	0	100
9	90	10
10	90	10

(A: 0,1 % Phosphorsäure; B: Acetonitril)

Fluß: 2 ml/min.

5.6.5 Plattendiffusionstest

Die quantitative Bestimmung der antibakteriell wirksamen Phenazine wurde mit dem Plattendiffusionstest, wie bei ZÄHNER & MAAS (1972) beschrieben, durchgeführt (vgl. auch II.7.1).

6. Physikalisch-chemische Charakterisierung der Phenazine

Photometrie bei 623 nm, Dünnschichtchromatographie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie sind in Kapitel II.5.6.2-II.5.6.4 beschrieben.

6.1 UV/VIS-Spektroskopie

Alle in dieser Arbeit beschriebenen UV/VIS-Spektren wurden mit Hilfe der Photodioden-Array-Technik, wie bei FIEDLER (1984) beschrieben, aufgenommen.

6.2 IR-Spektroskopie

IR-Spektren wurden mit einem Jasco A 202 Infrared Spektrophotometer (Jasco Spektroskopic CO. LTD., Japan) aufgenommen. Aus 2 mg reiner Testsubstanz und 100 mg KBr wurden KBr-Presslinge nach Firmenvorschrift angefertigt und mit dem Spektrophotometer gemessen.

7. Biologische Charakterisierung

7.1 Wirkungsspektrum

Mit Hilfe des Plattendiffusionstests (vgl. II.5.6.5) wurden alle isolierten (GEIGER, 1987) und synthetisierten Phenazine (BAHNMÜLLER, 1987) auf ihre biologische Aktivität gegen Bakterien und Pilze getestet.
Zur Testung kamen hierbei alle unter II.3.2 beschriebenen Testorganismen.

Alle Filterrondellen (ø 6 mm, Macherey & Nagel, Düren) wurden mit jeweils 20 µl der zu testenden Metabolite beschickt und bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Bestimmung der MHK-Werte erfolgte durch Extrapolation auf den Durchmesser der verwendeten Filterrondellen (= 6 mm). Bei diesem Wert ist gerade kein Hemmhof mehr meßbar. Er stellt somit die `Minimale Hemmkonzentration´ dar. Zur Berechnung wurden folgende Metabolitkonzentrationen eingesetzt: 3, 10, 30, 100 µg/ml. Alle Metabolite wurden in $CHCl_3$ gelöst und mit MeOH entsprechend verdünnt.

7.2 Biophotometerversuche

Um mögliche Diffusionsprobleme der verschiedenen Phenazinderivate beim Plattendiffusionstest auszuschließen, wurden alle Metabolite mittels Biophotometerversuche in Flüssigkultur auf ihre biologische Aktivität untersucht. Als sensibler Testkeim wurde Bacillus cereus gewählt. Bacillus cereus wurde als Übernachtkultur in Medium 2 nach Kapitel II.4.4 bei 37°C angezogen. In sterile Quarzküvetten (maximale Füllmenge 14 ml) wurden jeweils 9,8 ml Medium 2 gefüllt und mit 0,1 ml der Übernachtkultur angeimpft. Diese Küvetten wurden anschließend in ein Eppendorf-Photometer mit Umlaufautomaten für 24 Küvetten (Type KV-3, Firma Thomae, Biberach) gestellt. Die Transmission wurde bei allen Ansätzen optisch auf 90 %

eingestellt. Bei einer Inkubationstemperatur von 37°C wurden die Testkeime bis zur log-Phase (48-62 h) angezogen. Aus einer Metabolitstammlösung (1 mg/ml in DMSO) wurden die Küvetten mit jeweils 0,1 ml beschickt. In den Testansätzen lag somit eine Metabolitkonzentration von 0,1 mg/ml vor. Bei 37°C wurden sie für 12 h inkubiert. Die resultierenden Wachstumskurven wurden mit einem 12-Kanal Punktschreiber (Polykomp, Firma Hartman und Braun, Frankfurt) aufgezeichnet.

7.3 Test mit Caenorhabditis elegans N2 (in vivo)

Der Test wurde nach REUSCHENBACH (1986b) und BRENNER (1974) durchgeführt. Die Endkonzentration der getesteten Metabolite wurde mit S-Puffer (Medium 10) auf 20 µg/ml eingestellt.
Für die Durchführung des Versuches danke ich Frau I. Rindfleisch.

7.4 Test auf cytostatische Aktivität

Zum Test auf cytostatische Aktivität wurden alle Phenazine in DMSO zu einer Stammlösung von 1 mg/ml gelöst. Die verwendete Zellinie (Tumorzellinie: CCRF/CEM) wurde mit Medium 11 auf einen Titer von 2×10^5 Zellen/ml (= doppelt konzentriert) und die Metabolitstammlösung von 1 mg/ml mit Medium 11 auf eine Konzentration von 20 µg/ml eingestellt.
Die 'wells' der verwendeten 6-Loch-Kulturgefäße (Costar, Cambridge, Mass., USA) wurden mit 2 ml Metabolitenansatz und 2 ml Zellsuspension gefüllt. Somit wurde im Testansatz eine Metabolitkonzentration von 10 µg/ml und ein Titer von 1×10^5 Zellen/ml erreicht. Die Inkubation der Testansätze erfolgte für 48 h bei 37°C im Brutschrank (5 % CO_2).

Für die Bestimmung der Titer wurden zur Auswertung zwei verschiedene Verfahren gewählt:

1: Titerbestimmung mit dem Coulter counter (Model ZF, Coulter Electronics LTD., Luton, England).

2: Titerbestimmung nach Trypanblaufärbung (nach Vorschrift des Herstellers)

Zur Bestimmung der ID_{50}-Werte wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: 0,1, 1, 2, 3, 6 und 10 µg/ml. Das durch die Metabolite beeinträchtigte Wachstum der Zellinien wurde als Prozent des Wertes der jeweiligen Kontrolle auf halblogarithmischem Papier aufgetragen. Der ermittelte ID_{50}-Wert war diejenige Metabolitkonzentration, die das Wachstum der Zellen auf 50 % der Kontrolle reduzierte.

Für die Einführung in die Zellkulturtechnik und die ständige Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche danke ich Frau Dr. H. Diddens und Frau J. Rink.

8. Screening nach antimetabolit-resistenten Mutanten von TÜ 2706

Das Screening nach antimetabolit-resistenten Klonen von TÜ 2706 wurde wie bei OCHS (1987) beschrieben nach HOPWOOD et al. (1985) durchgeführt.

9. Aufarbeitung und Isolierung

9.1 Mycelextraktion

9.1.1 Mycelextraktion im Rührverfahren

Nach der Zugabe von 2% Celit wurden geerntete Kulturen von TÜ 2706 mit Hilfe einer Filterpresse oder Nutsche in Kulturfiltrat und Mycel getrennt. Das Mycel wurde mit einem MeOH/Aceton-Gemisch (1:1) versetzt, angesäuert (pH 3-4) und anschließend einige Stunden gerührt. Nach dem Abpressen des aufgeschlossenen Mycels und der Ab-

trennung des Mycelrohextraktes wurde je nach Färbung des Mycels dieses Verfahren einige Male wiederholt.

9.1.2 Mycelextraktion im Säulenverfahren

Die Trennung von Kulturfiltrat und Mycel wurde entsprechend II. 9.1.1 vorgenommen. Das Mycel wurde in wenig MeOH/Aceton-Gemisch aufgeschwemmt und in eine Glassäule (Länge 1 m, I.D. 10 cm, Firma Schott, Mainz) gefüllt. Zur Extraktion wurden 2-3 Liter MeOH/ Aceton-Gemisch auf die Säule geben. Am Auslauf der Säule konnte der intensiv grüngefärbte Mycelextrakt aufgefangen werden.

Der bei den Mycelextraktionen II.9.1.1 und II.9.1.2 erhaltene Mycelrohextrakt wurde bis zur wässrigen Phase am Rotationsverdampfer eingeengt und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Hierbei gingen die gelb und grün gefärbten Phenazine in die organische Phase über. Diese organische Phenazinphase wurde einrotiert und gewogen.

9.2 Petroletherfällung

Zu der einrotierten organischen Phenazinphase aus II.9.1 wurden langsam einige ml Petrolether zupipettiert. Der ganze Ansatz wurde anschließend für 10 bis 12 Stunden in ein Eiswasserbad gestellt.

9.3 Säulenchromatographie

9.3.1 Flash-Chromatographie

Zur Vorreinigung der Phenazine wurde die Flash-Chromatographie nach CRANE et al. (1981) eingesetzt.

Verwendete Säulengrößen und -materialien:

Flashsäule: I. Länge 61 cm, I.D. 3,7 cm, (J.T.Baker, Gross-Gerau)
II. Länge 100 cm, I.D. 10 cm, (Schott, Mainz)

Säulenmaterial: 1: Kieselgel 60 (Partikelgröße 40-63 µm) (Merck)
2: Baker Kieselgel (Partikelgröße 40 µm) (Baker)

Druck: max. 0,5 bar

Lösungsmittel: A: Aceton/Hexan (10:4)
B: CH_2Cl_2
C: CH_2Cl_2/MeOH (9:1)
D: CH_2Cl_2/MeOH (9:1) + 0,1 % Ameisensäure

Die von CRANE et al. (1981) beschriebene Methode der Flash-Chromatographie wurde etwas modifiziert. Als Säulenmaterialen wurden die beiden Kieselgelarten 1 und 2 im Verhältnis 2/3 (2) zu 1/3 (1) in dieser Reihenfolge übereinander gepackt. Desweiteren wurde die Elution der verschiedenen Phenazine durch den Einsatz verschiedener Lösungsmittel und -gemische erreicht. Zur Elution wurden die Lösungsmittel A-D eingesetzt.

Die eluierten Fraktionen wurden einrotiert und mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-Analyse auf ihren Gehalt an Phenazinen untersucht.

9.3.2 Präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Vorgereinigte Phenazinfraktionen aus der Flash-Chromatograhie wurden mit Hilfe der Präparativen Hochdruckflüssigkeitschromatographie weiter aufgereinigt.

Apparative Ausstattung:

Chromatograph: SP 8000 (Spektra Physics, Darmstadt)
Detektor: Spektralphotometer Typ 8700 mit variabler Wellenlänge (Firma Knauer, Bad Homburg)
Schreiber: PM 8202 (Philips, Holland)
Säule: Shandon Hypersil ODS 5 µm, Länge 25 cm, I.D. 1,6 cm
Vorsäule: HD-Silica 20-45 µm, Länge 3 cm, I.D. 1,6 cm
(Säule und Vorsäule, Firma Grom, Ammerbuch)
Probenschlaufe: 4 ml

Trennparameter:

Probe: Fraktionen aus II.9.3.1 in DMSO gelöst
Detektion: 254 nm
Fluß: 24 ml/min.
Eluent: Gradientenelution

	Mobile Phase	
Zeit (min.)	A (%)	B (%)
0	50	50
7	80	20
14	80	20
15	100	0
23	100	0
24	50	50
34	50	50

(A: MeOH (+ 0,1 % Ameisensäure)
B: 0,1 % Ameisensäure)

Die durch die Präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie erhaltenen Fraktionen wurden einrotiert und mittels HPLC-Analytik auf ihren Gehalt an Phenazinderivaten untersucht.
Gepoolte Fraktionen wurden für die weitere Aufreinigung eingesetzt.

Bei Herrn S. Gogolopoulos möchte ich mich für die Durchführung der Trennungen mit Hilfe der Präparativen Hochdruckflüssigkeitschromatographie bedanken.

9.3.3 Ausschlußchromatographie mit Sephadex LH 20

Zur Endreinigung der Esmeraldine und Phenazine wurde die Ausschlußchromatographie mit Sephadex LH 20 eingesetzt.

Säule: LKB 2237, Länge 100 cm, I.D. 10 cm (LKB, Karlsruhe)
Säulenmaterial: Sephadex LH 20 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
Eluent: MeOH (p.A.)
Fluß: 5-8 ml/h
Detektion: bei 254 nm (Gilson Photometer Modell 111, Abimed, Düsseldorf)

Die Esmeraldine konnten visuell detektiert werden.

Alle Fraktionen wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie und HPLC-Analytik auf ihre Reinheit untersucht. Durch Ansprühen der DC-Platten mit Vanillin/H_2SO_4 (MERCK, 1980) konnten noch vorhandene Fette und Fettsäuren sichtbar gemacht werden.

Die mit Hilfe der Aufarbeitung (II.9.) erhaltenen Reinsubstanzen wurden für physikalisch-chemische und biologische Untersuchungen eingesetzt.

III. ERGEBNISSE

1. Nachweis der Phenazine

1.1. Dünnschichtchromatographie

In den Tabellen 1 und 2 wurden die Rf-Werte der untersuchten Phenazine tabellarisch dargestellt.

Isolierte Phenazine:

Tabelle 1: Rf-Werte aller aus TÜ 2706 isolierten Phenazine

Metabolit	Laufmittelsystem I	Laufmittelsystem II
S 1 (Phenazin)	0,84	0,75
S 2	0,67	0,42
S 3 (Saphensäure)	0,6-0,66	0,4-0,54
S 6 (Saphenamycin)	0,8	0,58
S 7	0,9	0,63
S 8 (*)	0,54	0,73
S 9 (PZ-1-COOH)	0,72	0,54
S 11	0,55	0,70
Esmeraldin A	0,35	0-0,25
Esmeraldin B	0,3	0-0,11

(PZ-1-COOH: Phenazin-1-Carbonsäure; *: Genistein (kein Phenazin))

Esmeraldin A und B ließen sich nur im Laufmittelsystem I auftrennen und ergaben hier eindeutig bestimmbare Rf-Werte. Für alle anderen Phenazine erwies sich Laufmittelsystem II als geeignetes DC-System.

Synthetisierte Phenazine:

Tabelle 2: Rf-Werte aller synthetisierten Phenazine

Metabolit	Laufmittelsystem I	Laufmittelsystem II
SS 4	0,7	0,77
SS 3	0,74	0,4
SS 4 Toluylat	0,88	0,9
SS 4 Tol-Ethylester	0,9	1
SS 4 Benzoat	0,91	0,7
SS 4 p-Brom-Benzoat	0,86	0,7
SS 4 6-Methylsalicyl-säuremethylether A	0,92	1
SS 4 Ethylester	0,83	1
SS 4 Salicylat	0,86	0,73
SS 2	0,69	0,8
SS 4 Cap I	0,81	0,88
SS 4 Butyrat	0,83	0,53
SS 4 Caprylat	0,86	0,65
SS 4 Oleat	1	0,72
SS 4 Palmitat	1	0,68
S 3 Acetat	0,85	0,4
ES-A Methylderivat	0,6	0,31

(Laufmittelsystem I: $CHCl_3$: MeOH (9:1), II: Aceton: Hexan (10:4))

1.2 Photometrischer Nachweis der Esmeraldine

Die von TÜ 2706 produzierten Esmeraldine zeigten im UV/VIS-Spektrum Maxima bei 254, 369 und 623 nm. Eine Quantifizierung der Esmeraldinmenge, mit Hilfe der Photometrie bei 623 nm, war somit aus dem Mycelrohextrakt möglich (BRANDL, 1985).
Mit verschiedenen Konzentrationen an Reinsubstanzen der Metabolite Esmeraldin A und B in MeOH wurden Eichkurven erstellt.

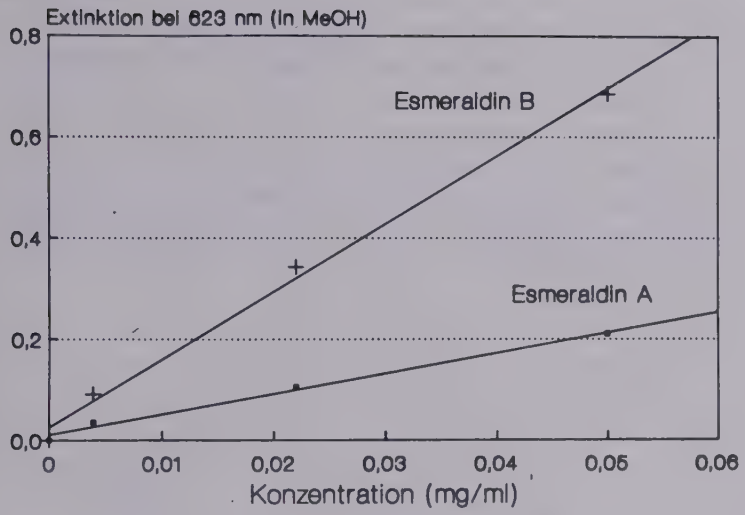


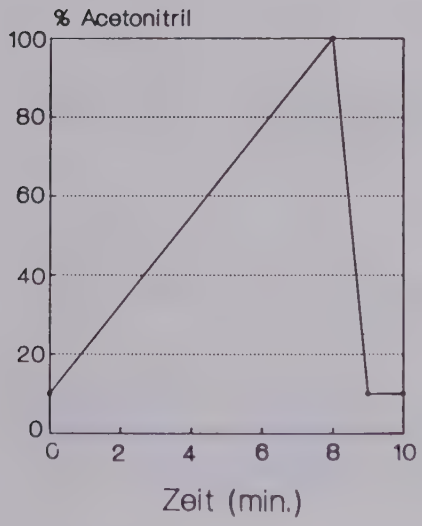
Abbildung 4: Eichkurven von Esmeraldin A und B in MeOH.

Beide Metabolite ließen sich bei 623 nm gut detektieren, zeigten jedoch divergierende Eichkurven. Die Photometrie bei 623 nm erlaubte somit nur die Bestimmung der Esmeraldingesamtmenge, für Optimierungsversuche eignete sich diese Methode nicht.

Alle anderen bearbeiteten Phenazinderivate zeigten Maxima bei 254 und 369 nm (vgl. III.5.1). Die Photometrie bei diesen Wellenlängen erbrachte keine eindeutigen Ergebnisse. Es konnte auch nicht zwischen den verschiedenen Metaboliten differenziert werden.

1.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie der Phenazine

Für den qualitativen und quantitativen Nachweis der bearbeiteten Phenazine wurde ein HPLC-System entwickelt. Dabei wurde bei der Optimierung der Trennparameter darauf geachtet, daß möglichst viele verschiedene Phenazine in einem Lauf getrennt und detektiert werden konnten.
Mit Hilfe der Gradientenelution und dem in Abb. 5 dargestellten Elutionsprofil konnten bis auf vier Metabolite (Esmeraldin A, Esmeraldin A-Methylderivat, S 11 und SS 4 Oleat) alle Phenazine chromatographiert werden.



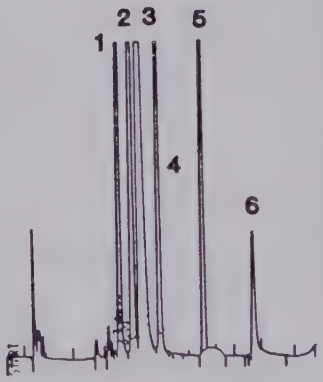


Abbildung 5:
Elutionsprofil bei der Gradientenelution der Phenazine.

Abbildung 6:

Chromatogramm eines Probengemisches mit sechs verschiedenen Reinsubstanzen (unterschiedliche Konzentrationen). 1: S 3, 2: SS 2, 3: Phenazin, 4: S3 Acetat, 5: Saphenamycin (S6), 6: Esmeraldin B.

Tabelle 3 zeigt eine Zusammenstellung aller Retentionszeiten der isolierten und synthetisierten Phenazine.

Die in einer Zeile gegenübergestellten isolierten und synthetischen Metabolite sind strukturell identisch.

Tabelle 3: Zusammenfassung von Retentionszeiten bei der Hochdruckflüssigkeitschromatographie der Phenazine.

Isolierte Metabolite	RT	RT	Synthetisierte Metabolite
S 3 (Saphensäure)	3,97	3,93	SS 4
S 8	3,99	-	-
S 9 (PZ-1-COOH)	4,32	-	-
S 2	4,39	4,36	SS 3
-	-	4,65	SS 2
S 1 (Phenazin)	4,75	-	-
-	-	4,81	SS4 Ethylester
-	-	5,31	S 3 Acetat
-	-	5,37	SS4 Methylsal. M.ether
-	-	6,32	SS4 Butyrat
-	-	6,55	Saphenamycinmethylether
S 6 (Saphenamycin)	6,71	-	-
-	-	6,84	SS4 Salicylat
-	-	6,98	SS4 Toluylat
-	-	7,30	SS4 p-Brom-Benzoat
-	-	7,60	SS4 Toluylat-Ethylester
-	-	7,92	SS4 Caprylat
Esmeraldin B	8,22	-	-
-	-	8,27	SS4 Benzoat
-	-	8,34	SS4 Palmitat
-	-	8,44	SS4 Cap I
S 7	8,85	-	-

(RT = Retentionszeit in min., SS4 Methylsal.M.ether = SS4-Methylsalicylsäure Methylether)

Zur quantitativen Bestimmung aller Phenazine wurden Eichkurven erstellt.

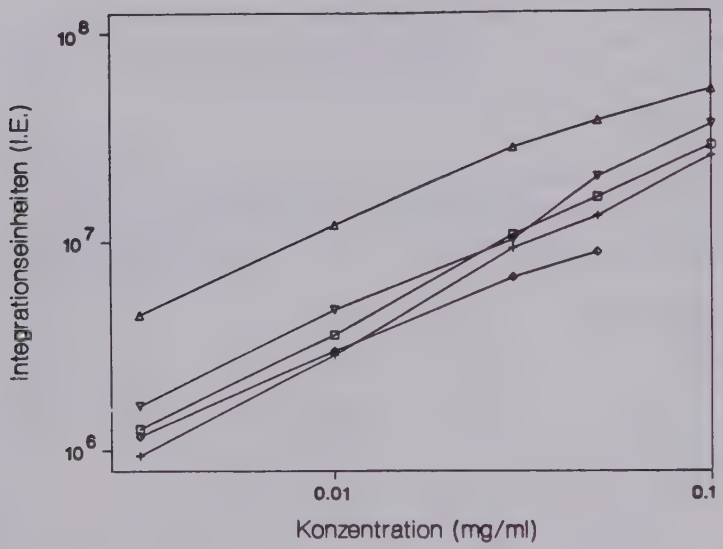


Abbildung 7: Eichkurven zur quantitativen Phenazinbestimmung.
▽ S 2 + S 6 □ S 3 △ Phenazin ◇ ES-B

Die abgebildeten Eichkurven zeigen den linearen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Peakflächen und den jeweiligen Metabolitkonzentrationen. Außerhalb des linearen Bereichs liegende Konzentrationen wurden in den linearen Meßbereich verdünnt.

2. Optimierung der Nährlösung

2.1 Komplexe Nährlösungen

Die von TÜ 2706 gebildeten Phenazine wurden bislang mit der komplexen Nährlösung 19 (Medium 13) produziert. Nach der Strukturaufklärung von S 6, das als das von KITAHARA et al. (1982) beschriebene Saphenamycin identifiziert werden konnte und der Erkenntnis,

daß TÜ 2706 Metabolite aus dem Phenazinstoffwechsel produziert, wurden einige in der Literatur beschriebene Medien für die Produktion von Phenazinen getestet.

Tabelle 4 zeigt die gebildeten Phenazinmengen in diesen Produktionsmedien nach 192 h im Kolbenversuch.

Tabelle 4: Gebildete Phenazinmengen in verschiedenen Komplexmedien nach 192 h im Kolbenversuch.

Medium	Phenazinmenge (mg/l)	Stimulation zu NL 19
Medium 13	103,00 (S2/S3, S6, ES-B)	Kontrolle
Medium 14	48,64 (nur S2/S3)	- 52,78 %
Medium 15	0 (keine Phenazinbildung)	-
Medium 16	31,94 (nur S2/S3)	- 69,29 %
Medium 17	65,20 (nur S2/S3)	- 36,70 %

In den Medien 14, 16 und 17 wurden Phenazine gebildet, jedoch nur die Metabolite S 2 und S 3. Zudem lagen die Mengen dieser Metabolite deutlich unter denen, wie sie mit Medium 13 erzielt werden konnten. Als komplexe Nährlösung erwies sich Medium 13 für die Produktion von verschiedenen Phenazinen als geeignet.

2.1.1 Variation von Nährlösung 19 (Medium 13)

Im Rahmen einer Diplomarbeit (BRANDL, 1985) konnte gezeigt werden, daß mit der variierten Nährlösung 19 (2 % Sojamehl und 5 % Mannit) die besten Ausbeuten an Esmeraldin B erzielt werden konnten. Diese Ergebnisse wurden durch Extinktionsmessung der Esmeraldingesamtmenge bei 623 nm in MeOH ermittelt (vgl. III.1.2). Mit Hilfe der HPLC sollten diese Ergebnisse überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden.

Abbildung 8 zeigt die gebildeten Phenazinmengen (dargestellt als Phenazingesamtmenge) bei der Variation von Sojamehl (N-Quelle) und Mannit (C-Quelle) nach unterschiedlichen Fermentationszeiten.

Für die Bildung von Phenazinen erwies sich Nährlösung 19 mit einer Zusammensetzung von 2 % Sojamehl und 5 % Mannit als am geeignetsten. Die Ergebnisse der Diplomarbeit (BRANDL, 1985) konnten bestätigt werden.

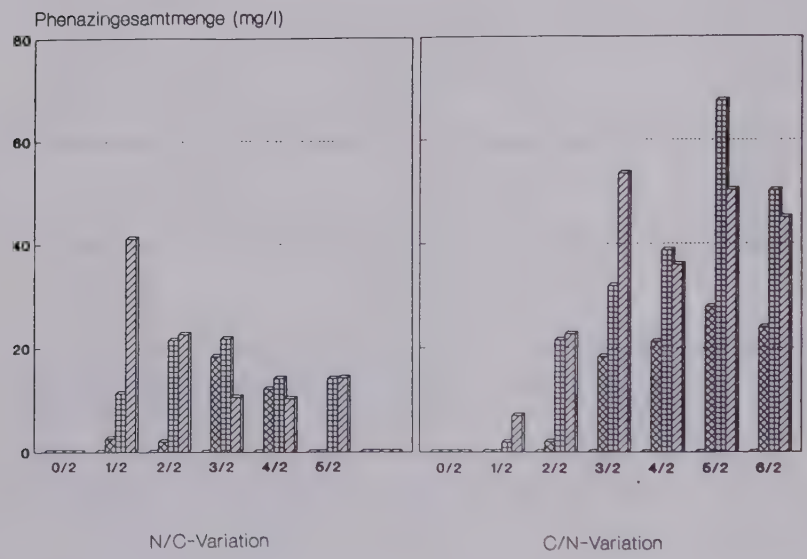


Abbildung 8: Variation von Medium 13; Variation der N-Quelle (Sojamehl) bei konstanter C-Quelle (N/C-Variation) und Variation der C-Quelle (Mannit) bei konstanter N-Quelle (C/N-Variation), dargestellt Phenazinmengen nach verschiedenen Fermentationszeiten, Angaben der N- und C- Quelle in Gewichtsprozent.

96 h 120 h 168 h

2.1.2 Variation der Belüftung

Auch dieser Fermentationsparameter wurde mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie noch einmal überprüft und konnte be-

stätigt werden. Bei Kolbenversuchen wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich und 100 ml Füllmenge auf der rotierenden Schüttelmaschine die höchsten Phenazinmengen erzielt.

2.1.3 Temperaturgradient

Zur Ermittlung der optimalen Produktionstemperatur für die Phenazine wurden verschiedene Versuche am Temperaturgradienten durchgeführt (vgl. II.4.6 und II.4.6.1).

Abbildung 9 zeigt den nach II.4.6 durchgeführten Versuch im Temperaturgradienten.

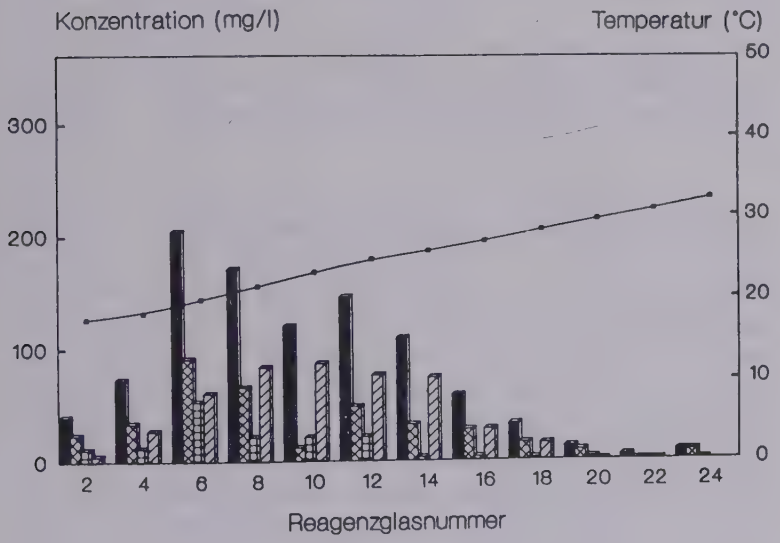


Abbildung 9: Temperaturgradient, Mycelextrakte nach 192 h.

Gesamt S2/S3 S6 ES-B

Die beste Phenazinproduktion konnte nach 192 h in einem Temperaturbereich zwischen 20 und 25°C ermittelt werden. Für den Metaboliten Esmeraldin B wurde das Produktionsmaximum auch in diesem Bereich bestimmt. Die Produktion der Phenazine in den Reagenzgläsern 25-30 wurde in Abbildung 9 nicht berücksichtigt, da sie unter 1 mg/l lag. Die erreichten Biomassen lagen durchschnittlich zwischen 14 und 16 g/l. Ein charakteristisches Temperaturoptimum für das Wachstum konnte nicht festgestellt werden, lediglich bei Temperaturen über 33°C war das Wachstum reduziert (Biomasse: 8 g/l).

Die Temperaturoptima für das Wachstum von Streptomyceten und die Produktion von sekundären Metaboliten in der Idiophase können in unterschiedlichen Bereichen liegen (CRUEGER & CRUEGER, 1982). Um dies zu untersuchen, wurde nach II.4.6.1 ein Temperaturshift durchgeführt.
Das Temperaturoptimum für die Bildung der Phenazine konnte zwischen 19 und 23°C ermittelt werden. In den Reagenzgläschen wurde eine durchschnittliche Biomasse von 19,5 g/l bestimmt.

2.2 Resting cell Kulturen und Verfütterungsversuche

Für Untersuchungen zur Biosynthese und Regulation von sekundären Stoffwechselprodukten eignet sich die sogenannte 'Resting cell Technik'. Bei dieser Technik läßt man den Produzentenstamm in komplexen Wachstumsmedien bis zur stationären Phase anwachsen, und wechselt dann durch geeignete Methoden (Abzentrifugieren der Kulturen (KURTH, 1981), durch Filtration (DELZER, 1983) oder durch Cross Flow Filtration (vgl. III.3.2)) das Wachstumsmedium durch ein definiertes Produktionsmedium aus (DEMAIN & KENNEL, 1978). Die Verwendung von definierten Medien in der Idiophase bietet den Vorteil, daß diese Medien gezielt verändert und an die Produktion der gewünschten Sekundärmetabolite exakt angepaßt werden können. Eine Stimulation oder Hemmung durch verfütterte Vorstufen oder andere Effektoren kann direkt, ohne störende Einflüsse auf das Wachstum, festgestellt und beurteilt werden.

2.2.1 Suche nach einem geeigneten Resting cell Medium

In zahlreichen Arbeiten (z.B. bei der Bearbeitung der Bafilomycine (BLANK, 1987) und der Maduraferrine (HUHN, 1986)) war der Ausgangspunkt bei der Suche nach einem geeigneten Resting cell Medium das für die Nikkomycine beschriebene (KURTH, 1981) und von DELZER (1983) optimierte System. Entsprechend den speziellen Anforderungen wurde das Medium angepaßt.

2.2.1.1 Vergleich der Phenazinproduktion in den Medien 19 und 21

Zellsuspensionen von TÜ 2706 wurden nach II.4.5.1 hergestellt und in den Medien 19 (IV) und 21 (Delzer) auf ihre Produktion an Phenazinen untersucht. In der Tabelle 5 wurden die am Produktionsmaximum gemessenen Phenazinmengen aufgelistet.

Tabelle 5: Gebildete Phenazinmengen in definierten Resting cell Medien.

Medium	S2/S3	S 6	ES-B	Gesamtmenge (mg/l)
19 (IV)	22,5	68,9	69,8	161,2
21 (Delzer)	1,5	3,3	9,6	14,6

Im unveränderten Medium 19 konnte etwa die 10-fache Phenazinmenge wie in Medium 21 erreicht werden. Auch eine durchgeführte Variation von Medium 21 erbrachte keine mit den in Medium 19 vergleichbaren Produktionsraten. Für weitere Resting cell Versuche wurde deshalb Medium 19 verwendet.

2.2.2 Variation des verwendeten Resting cell Mediums

Eine Variation von Medium 19 hatte zum Ergebnis, daß die Zusammensetzung für die Produktion von Phenazinen nicht sehr verändert

werden mußte. Lediglich auf Biotin konnte verzichtet werden und Glukose wurde durch Mannit ersetzt. Die erzielten Ausbeuten an Phenazinen lagen bei der Verwendung von Mannit als C-Quelle (= Medium 20) nicht wesentlich über denen, die mit Glukose erreicht werden konnten. Dennoch wurde bei allen weiteren Versuchen das teurere Mannit eingesetzt, da es sich um eine langsam metabolisierbare C-Quelle handelte.
Ein Ersatz von Asparagin als N-Quelle durch Ammoniumsalze wurde nicht untersucht.

Für alle durchgeführten Resting cell Versuche wurde das optimierte Medium 20 verwendet.

Für die Produktion von Phenazinen im Resting cell System erwiesen sich 72-96 h alte Vorkulturen als am geeignetsten.

2.2.3 Verfütterungsversuche

2.2.3.1 Verfütterung von aromatischen Metaboliten

Die Biosynthese von Phenazinen wurde vorwiegend bei Pseudomonaden untersucht (LONGLEY et al., 1972). Alle Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, daß die Phenazine über den Stoffwechselweg für aromatische Aminosäuren synthetisiert werden (Zusammenstellung der entsprechenden Literaturstellen in IV. DISKUSSION). Zur Untersuchung der Phenazinbiosynthese wurden an Streptomyces antibioticus (TÜ 2706) verschiedene aromatische Metabolite verfüttert.

Abbildung 10 zeigt einen typischen Fermentationsverlauf im optimierten Resting cell System am Beispiel der Produktion von Esmeraldin B. Nach 72-120 h konnte das Produktionsmaximum mit etwa 80 mg/l ES-B ermittelt werden. Die Zugabe von Anthranilsäure als mögliche Vorstufe erbrachte keine Ausbeutesteigerungen. Bei der Verfütterung von 0,1 mM lagen die gemessenen ES-B Mengen im Bereich der Kontrolle. Höhere Anthranilsäurekonzentrationen (1 und 5 mM) führten zu einer Verschlechterung der Esmeraldin B-Bildung, die ab

5 mM vollständig gehemmt war. Für die untersuchten Phenazinderivate S2/S3 und S 6 konnte Entsprechendes gemessen werden.

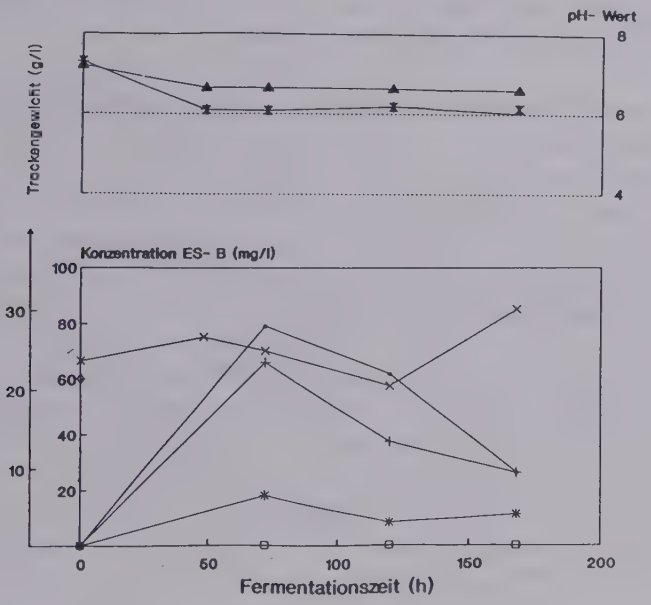


Abbildung 10: Darstellung eines typischen Fermentationsverlaufs im Resting cell System (Medium 20); Produktion von Esmeraldin B nach Zugabe von 0,1, 1 und 5 mM Anthranilsäure (abgekürzt als AA).

IV (Mannit) — 0,1 mM AA — 1 mM AA — 5 mM AA
TG (IV) — pH (IV) — pH (5 mM AA)

Die Zugabe von Anthranilsäure führte zu einem leichten Absinken des pH-Wertes, der jedoch immer zwischen pH 6 und 7,5 lag. Bei der Betrachtung der Biomassen konnten Werte zwischen 20 und 25 g/l gemessen werden. Ein ausgeprägtes Wachstum der Zellen im Resting cell Medium war nicht zu beobachten.

Die Verfütterung weiterer aromatischer Metabolite wie Anthranilsäureamid, p-Aminobenzoesäure, Phenylalanin, Phenylessigsäure, N-Benzoyl-N-phenylhydroxylamin und Tryptophan erbrachte keine Stimulation der Phenazinproduktion. Alle Metabolite wurden in verschie-

denen Konzentrationen zugegeben (0,1, 1, 2, 5, 10 mM). Meist konnten bei Metabolitkonzentrationen über 5 mM keine Phenazine mehr im Mycelextrakt nachgewiesen werden. Der Phenazinstoffwechsel war bei diesen Konzentrationen vollständig gehemmt.

Abbildung 11 zeigt die gemessenen Stimulationen bei der Verfütterung von Shikimisäure, Tyrosin und der kombinierten Shikimisäure/Tyrosin-Verfütterung.
Durch die Zugabe von 5 mM Shikimisäure konnte die Produktion von ES-B um 70 % stimuliert werden. Auf die Bildung der Phenazine S2/S3 und S 6 schien Shikimisäure jedoch keinen Einfluß zu haben.
Bei der Verfütterung von Tyrosin konnten bei Konzentrationen zwischen 0,5 und 5 mM Stimulationen von maximal 125 % beobachtet werden. Tyrosin hatte auf alle untersuchten Phenazine einen stimulierenden Effekt. Saphenamycin wurde bei 2 und 5 mM Tyrosin und Esmeraldin B bei 1 mM am besten produziert. Wie schon bei anderen aromatischen Metaboliten festgestellt werden konnte, war bei 10 mM Tyrosin die Phenazinproduktion gehemmt.

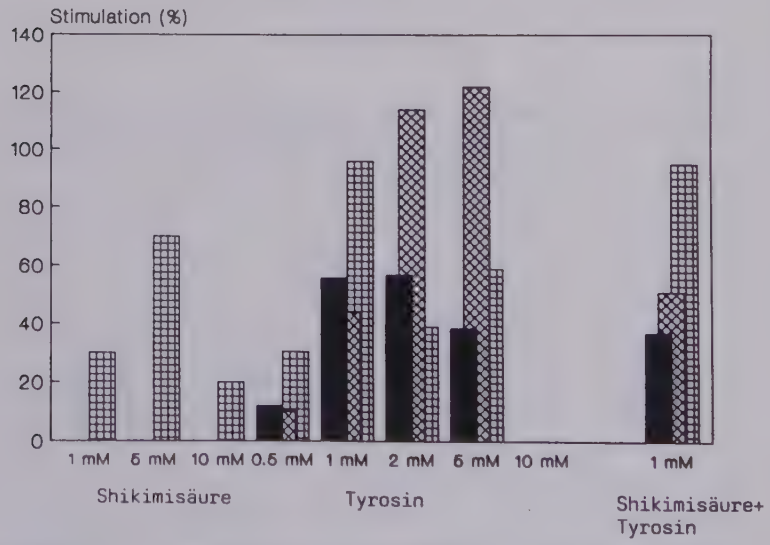


Abbildung 11: Verfütterung von Shikimisäure, Tyrosin und Tyrosin+ Shikimisäure im Resting cell System; die Stimulationen (%) wurden am Produktionsmaximum gemessen.

S2/S3 S6 ES-B

Eine kombinierte Verfütterung von Tyrosin und Shikimisäure erbrachte keine besseren Produktionsraten gegenüber alleiniger Verfütterung von Tyrosin.

2.2.3.2 Verfütterung von α-Ketosäuren

Bei der Suche nach möglichen Vorstufen der Saphensäure wurden folgende α-Ketosäuren verfüttert: Phenyl-, Furylglyoxylsäure, Cyclopropylglyoxylsäureamid und Trimethylpyruvat.
Lediglich bei der Zugabe von Trimethylpyruvat konnten Ausbeutesteigerungen für die untersuchten Phenazine beobachtet werden.

Tabelle 6: Stimulationen (%) des Phenazinstoffwechsels bei der Zugabe verschiedener Konzentrationen an Trimethylpyruvat.

	Phenazine		
Konzentration:	S2/S3	S 6	ES-B
1 mM	154	600	154
10 mM	44	410	41
50 mM	0	0	0

Die besten Ausbeutesteigerungen erbrachte die Zugabe von Trimethylpyruvat in einer Konzentration von 1mM.

2.2.3.3 Verfütterung von Metallen

Abbildung 12 zeigt, daß durch die Zugabe von 5 mM $MgCl_2$ sehr große Ausbeutesteigerungen (600 %) erzielt werden konnten. Bei Konzentrationen von 10 mM konnten keine Phenazine mehr nachgewiesen werden. Der Phenazinstoffwechsel war bei diesen Konzentrationen gehemmt.

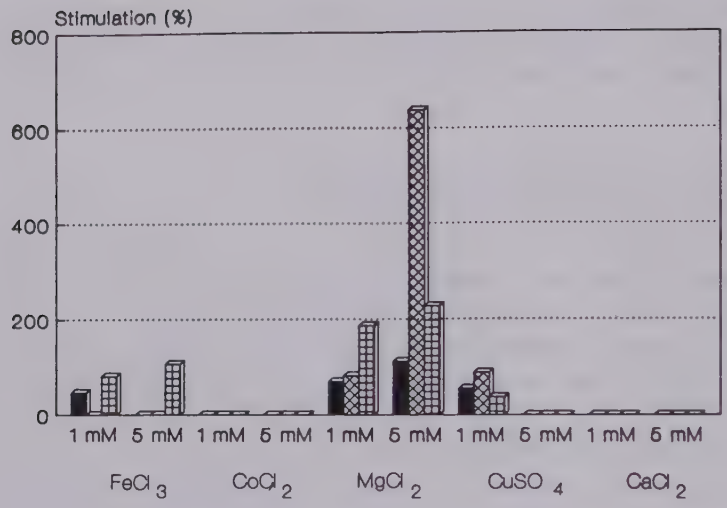


Abbildung 12: Verfütterung von $FeCl_3$, $MgCl_2$, $CuSO_4$, $CoCl_2$ sowie $CaCl_2$ im Resting cell System.

S2/S3 S6 ES-B

Eine kombinierte Verfütterung mit allen positiven Effektoren wurde nicht durchgeführt.

2.3 Suche nach antimetabolit-resistenten Mutanten von TÜ 2706

Bei der Verfütterung von möglichen Vorstufen oder Effektoren im Resting cell System konnten durch die Zugabe von Tyrosin, Shikimisäure oder Trimethylbrenztraubensäure Ausbeutesteigerungen bei der Produktion der Phenazine erzielt werden. Dies war nur bis zu bestimmten Konzentrationen dieser Effektoren (meist zwischen 1 und 5 mM) möglich. Höhere Konzentrationen hatten häufig hemmende Effekte auf die Produktion der erwünschten Metabolite.

Um mögliche Regulationsmechanismen bei der Phenazinbiosynthese auszuschalten, wurde nach analogresistenten Mutanten von TÜ 2706 gesucht. Es wurden Antimetabolite von Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin eingesetzt (MALIK, 1979).

gesucht. Es wurden Antimetabolite von Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin eingesetzt (MALIK, 1979).
Alle Antimetabolite wurden in drei Konzentrationen getestet: 10, 1, 0,1 mg/ml. Nur bei m-Fluor-Tyrosin und einer Konzentration von 10 mg/ml konnten `Satellitenkolonien´ und somit antimetabolit-resistente Mutanten erhalten werden. Alle Mutanten wurden geklont, auf Schrägagarröhrchen überimpft und nach der Sporulation in Flüssigkultur charakterisiert.

2.3.1 Charakterisierung analogresistenter Mutanten von TÜ 2706

Von den erhaltenen Mutanten (III.2.3) wurden sieben in Medium 13 bis zur stationären Phase (96 h) angezogen und nach dem Resting cell Verfahren (II.4.5) in Medium 20 gegeben, das mit jeweils 20 mM Tyrosin oder Anthranilsäure supplementiert war.

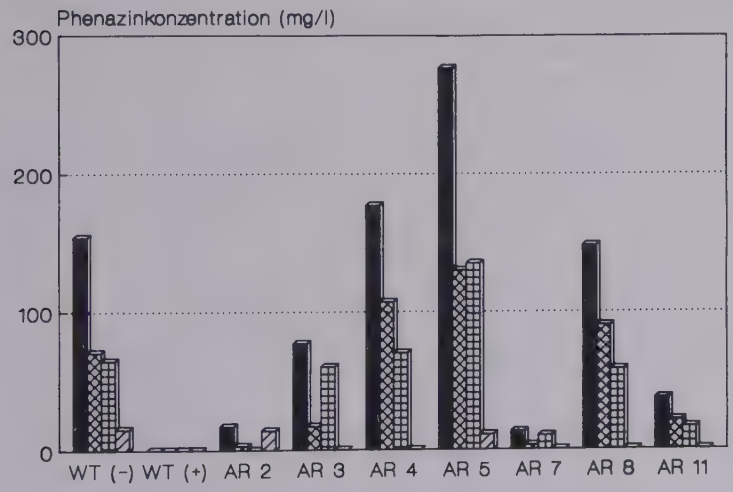


Abbildung 13: Test verschiedener analogresistenter Mutanten (AR) von TÜ 2706 auf Phenazinproduktion bei der Verfütterung von 20 mM Tyrosin; WT (-) = Wildtyp ohne Tyrosin, WT (+) = Wildtyp mit 20 mM Tyrosin.

Bei den durchgeführten Verfütterungsversuchen mit 20 mM Anthranilsäure konnten keine stimulierenden Effekte festgestellt werden. Die Produktion der Phenazine war vielmehr vollständig gehemmt. (vgl. III.2.2.3.1)

Beim Vergleich der sieben erhaltenen Klone, mit dem Wildtyp von TÜ 2706, konnte durch die Verfütterung von Tyrosin festgestellt werden, daß die Hemmung der Phenazinproduktion durch hohe Konzentrationen an Tyrosin (20 mM) bei den analogresistenten Mutanten aufgehoben war. Beim Wildtyp war die Phenazinbildung durch diese Tyrosinkonzentration vollständig gehemmt (vgl. WT(+)). Für die analogresistenten Mutanten AR 4 und 5 konnten Ausbeutesteigerungen im Vergleich zum Wildtyp (WT(-)) gemessen werden.
Die ermittelten Trockengewichte waren bei allen Ansätzen ungefähr gleich, sodaß die Ausbeutesteigerungen nicht auf höhere Biomassen zurückgeführt werden konnten, sondern vielmehr echte Stimulationen darstellten.

3. Batch Fermentationen im 10 l Blattrührsystem (Biostat E)

3.1 Batch Fermentationen mit Medium 13

Im `scale up´ wurde versucht, die in Kolbenversuchen ermittelten Parameter für die Produktion der Phenazine und hier in besonderem Maße für die Herstellung von Esmeraldin B, auf größere Bioreaktoren zu übertragen.
Der Kulturverlauf einer Fermentation in einem 10 l Blattrührfermenter (Typ Biostat E) ist in Abbildung 14 dargestellt. Es handelt sich um die optimierte Fermentationsführung, nach erfolgter Variation von Belüftung, Drehzahl, Animpfdichte und dem Alter der Vorkulturen.

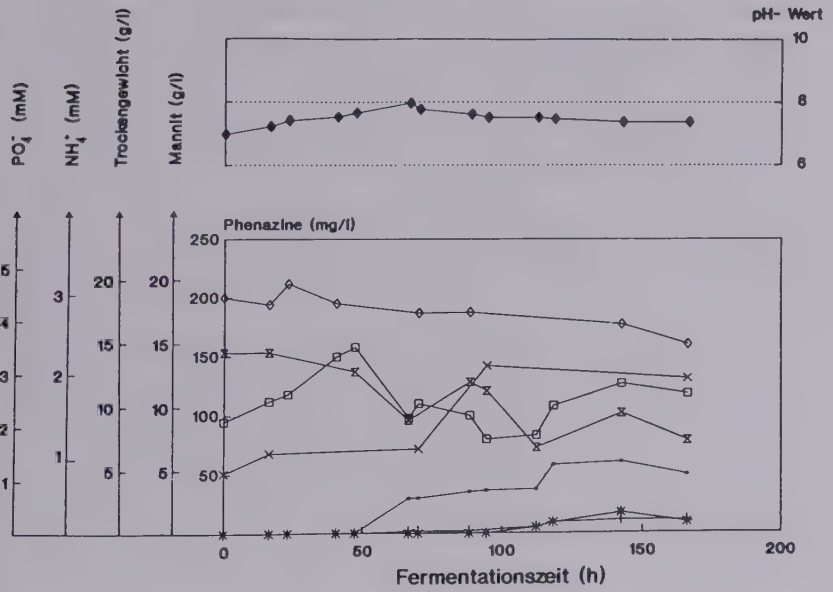


Abbildung 14: Fermentationsverlauf von TÜ 2706 im 10 l Blattrührfermenter (Biostat E) bei 0,6 vvm, 260 rpm und 22°C.

S2/S3 — S6 — ES-B — Trockengewicht
NH_4^+ — Mannit — PO_4^- — pH

Streptomyces antibioticus (TÜ 2706) wuchs nach dem Animpfen mit 10% einer 48 h alten Vorkultur schnell an und erreichte nach 50-60 Stunden Fermentationszeit die maximale Biomasse von ca. 15 g/l. Die im Medium gemessenen Mannit- und NH_4^+-Mengen veränderten sich in dieser Zeit nur geringfügig, wohingegen die Phosphatmenge mit dem Wachstum der Zellen abnahm. Die Produktion der Phenazine setzte nach 50-70 Stunden ein und fiel zeitlich ungefähr mit dem Ende der Tropho- und dem Beginn der Idiophase zusammen. Nach einer Fermentationszeit von ca. 150 h war das Produktionsmaximum der Phenazine mit einer Gesamtmenge von 88,7 mg/l erreicht. Diese Gesamtmenge teilte sich in 60,7 mg/l S2/S3, 11 mg/l S 6 und 17 mg/l Esmeraldin B auf. Mit der Bildung der Phenazine konnte ein Ansteigen der NH_4^+-Menge und eine langsame Verringerung der Mannitmenge beobachtet werden. Die Phosphatmenge nahm nach dem Ende des Zellwachstums wieder etwas zu, sank aber mit steigender Phenazinproduktion auf 2,1 mM ab.

Zu den gemessenen Fermentationsparametern gehörten auch der pH-Wert und der Sauerstoffpartialdruck (pO_2). Der pH-Wert zeigte während der ganzen Fermentationszeit keine großen Schwankungen. Er lag zwischen pH 7 und 8. Bei allen Fermentationen sank der Sauerstoffpartialdruck während des Zellwachstums nie unter 40 %. Nach dem Ende der Trophophase stieg er wieder auf 70-80 % an. Eine Sauerstoffsättigung des Mediums war somit zu jeder Zeit gewährleistet.

Es wurde versucht, die im Temperaturgradienten (III.2.1.3) erhaltenen Ergebnisse auf die Fermentationen im 10 l Blattrührsystem zu übertragen, dabei konnten jedoch keine signifikanten Ausbeutesteigerungen erzielt werden. Es wurde dennoch bei allen Fermentationen ein Temperaturshift von 27°C beim Animpfen, auf 22°C ab dem Beginn der Idiophase durchgeführt.

3.1.1 Verfütterungsversuche bei Fermentationen mit Medium 13

Bei den unter III.2.2.3 beschriebenen Verfütterungsversuchen war festgestellt worden, daß durch die Verfütterung von Tyrosin und Shikimisäure die Produktion der Phenazine stimuliert werden konn-

te. Bei den durchgeführten Fermentationen im 10 l Blattrührfermenter sollte überprüft werden, ob sich diese Stimulation auch auf Fermentationen im größeren Maßstab und bei der Verwendung von komplexen Nährmedien übertragen ließ.
Die Fermentationsführung entsprach den bei III.3.1 beschriebenen Fermentationen. Nach 80 h wurden jedoch aus einem angeschlossenen Vorratsgefäß langsam (ca. 55 ml/h) vier Liter einer 0,1 M Tyrosin- und einer 0,01 M Shikimisäurelösung in den Bioreaktor gepumpt. In Abbildung 15 wurde der Beginn dieser Zugabe mit einem Pfeil gekennzeichnet.
Am Wachstumsverlauf der Kultur, der bis zu einer Fermentationsdauer von ca. 60 h entsprechend den anderen Fermentationen verlief, machte sich nach 80-100 Stunden die Zugabe der Supplemente am Rückgang der Biomasse auf 9 g/l bemerkbar. Gleichzeitig konnte eine starke Abnahme der Mannitkonzentration beobachtet werden. Die Produktion von Phenazinen hatte nach 50 h mit der Bildung der Derivate S2/S3 eingesetzt und nach 90 h konnte Esmeraldin B im Mycelextrakt nachgewiesen werden. Nach der Zugabe der Tyrosin/Shikimisäurelösung kam es zu einem starken Anstieg der Saphenamycinkonzentration. Die Konzentrationen an S2/S3 und Esmeraldin B stiegen nicht in dem Maße wie bei Saphenamycin. Mit der verstärkten Produktion der Phenazine kam es zu einer weiteren Abnahme der Mannitmenge. Die Biomasse blieb bis zum Ende der Fermentation konstant zwischen 9 und 10 g/l.
Auch bei diesen Fermentationen konnte das Produktionsmaximum der Phenazine nach einer Fermentationsdauer von ungefähr 150 h bestimmt werden. Die ermittelte Phenazingesamtmenge lag zu diesem Zeitpunkt bei 287 mg/l. Dies stellte eine Steigerung von 320 % zu den Batch Fermentationen aus III.3.1 dar. Bei der Betrachtung der verschiedenen Phenazine konnten folgende Ausbeuten und Stimulationen erzielt werden:

- S2/S3 : Menge: 63,6 mg/l ; keine Stimulation meßbar
- S 6 : Menge: 171 mg/l ; Stimulation um den Faktor 15
- ES-B : Menge: 52,4 mg/l ; Stimulation um den Faktor 3

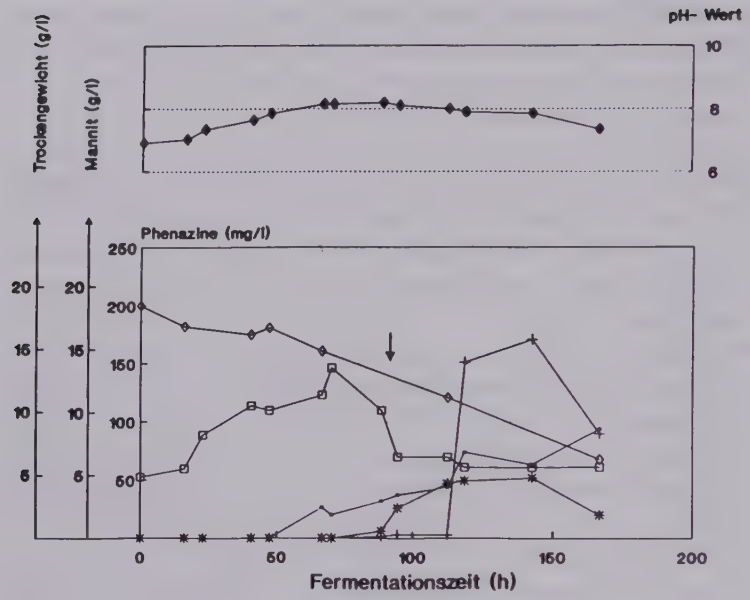


Abbildung 15: Verfütterung von Tyrosin und Shikimisäure an TÜ 2706 bei Fermentationen im 10 l Blattrührfermenter; Belüftung 0,6 vvm, Drehzahl 260 rpm, Temperatur 22°C, der Pfeil kennzeichnet den Beginn der Zugabe der Tyrosin/Shikimisäurelösung.

S2/S3 S6 ES-B

Trockengewicht Mannit pH

Eine Stimulation der Phenazinbildung durch Zufütterung von Tyrosin und Shikimisäure konnte auch bei Fermentationen in 10 l Blattrührfermentern mit Medium 13 erreicht werden.

3.2 Cross Flow Fermentationen

Resting cell Versuche (III.2.2) hatten gezeigt, daß Kulturen von TÜ 2706 nach dem Erreichen der stationären Phase in definiertem Medium (Medium 20), nach dem Entfernen des komplexen Wachstumsmediums, Phenazine bilden konnten. Diese definierten Produktionsmedien boten zum einen den Vorteil, daß sie für Ausbeutesteigerungen und für Untersuchungen zur Biosynthese von Metaboliten gezielt verändert werden konnten, zum anderen konnte aber auch das gebildete Metabolitenmuster reduziert werden. Dies war besonders für Aufarbeitungen von Bedeutung.
Ein `scale up´ derartiger Versuche sollte mit Cross Flow Experimenten bei Fermentationen in 10 l Blattrührfermentern begonnen werden.

Beim Vergleich des Fermentationsverlaufs mit der in III.3.1 beschriebenen Batch Fermentation in Medium 13, konnte bis zu einer Fermentationsdauer von 95 h eine gute Übereinstimmung festgestellt werden. Nach 95 h wurde die in II.4.7.3.2 beschriebene Cross Flow Apparatur angeschlossen und 5 l Nährlösung 19 (2/5) durch 7 l Medium 20, welches mit Tyrosin supplementiert war (Tyrosinendkonzentration im Biostat E Fermenter mit 12 l Medium = 5 mM) , ausgetauscht. Während der durchgeführten Cross Flow Filtration kam es zu einem Anstieg der Biomasse (gemessen anhand des Trockengewichts und der Viskositätsbestimmung; beide Bestimmungen wurden im Diagramm nicht dargestellt), gleichzeitig konnte eine rasche Abnahme der NH_4^+-Menge im Kulturfiltrat beobachtet werden. Nachdem der Austausch des Mediums beendet war, kam es zu einem Absinken der Biomasse und einem starken Anstieg der NH_4^+-Menge. Die Biomasse blieb bis zum Fermentationsende konstant bei ca. 10-12 g/l.
Bei der Berechnung der gebildeten Phenazinmengen nach ca. 150 h konnten keine den Resting cell Versuchen (III.2.2) vergleichbaren Werte erzielt werden (33,47 mg/l S2/S3, 5,22 mg/l S 6 und 38,42 mg/l ES-B). Beim Vergleich mit den durchgeführten Batch Fermentationen (III.3.1) mußte eine um 10 % schlechtere Ausbeute festgestellt werden. Lediglich bei der Betrachtung der gebildeten Esmeraldin B-Menge wurde eine leichte Stimulation (Faktor 2) er-

rechnet. Ein wichtiges Ergebnis dieser Cross Flow Versuche war jedoch, daß das Metabolitenmuster weitgehend auf Phenazinderivate reduziert war.

Während der ganzen Fermentation wurden zu verschiedenen Zeiten, vor allem während der Cross Flow Filtration, Kulturproben mikroskopisch untersucht. Hierbei konnten am Mycel keine morphologischen Veränderungen festgestellt werden.

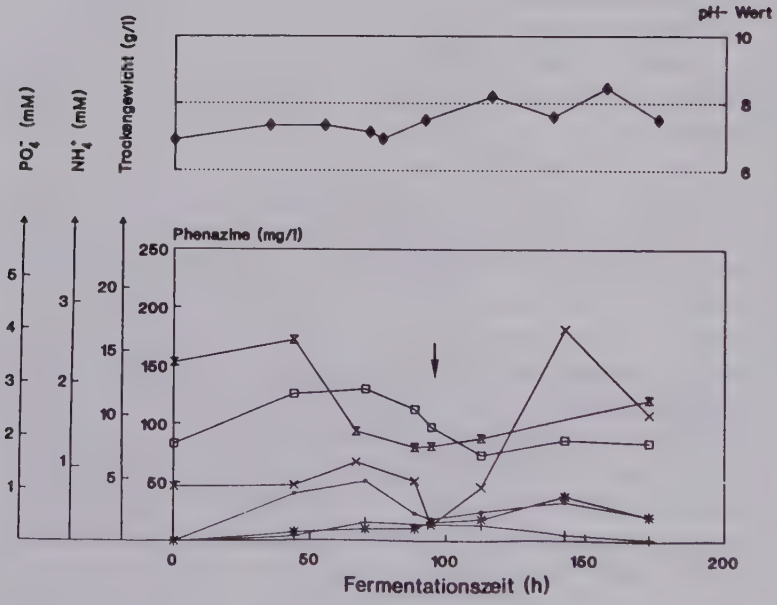


Abbildung 16: Fermentationsverlauf einer Cross Flow Fermentation von TÜ 2706 im 10 l Blattrührfermenter (Typ Biostat E) bei 0,6 vvm, 260 rpm und 22°C, der Pfeil kennzeichnet den Beginn des Medienaustauschs.

S2/S3 — S6 — ES-B — Trockengewicht

NH_4^+ — PO_4^- — pH

4. Aufarbeitung

4.1 Extraktionsverfahren

Das Kulturfiltrat konnte verworfen werden, da es nur geringe Konzentrationen an Phenazinen (keine Esmeraldine) enthielt. Der Großteil der Phenazine verblieb im Mycel und mußte hieraus extrahiert werden. Die Extraktion von Metaboliten aus dem Mycel wurde im Rührverfahren mit MeOH oder einem MeOH/Aceton-Gemisch (1:1) vorgenommen. Hierzu wurde je Ausgangsvolumen der Kultur die halbe Menge an Lösungsmittel eingesetzt.
Bei diesem Verfahren wurden große Mengen an Lösungsmitteln verbraucht. Zudem waren vor allem bei Aufarbeitungen im 200 l Maßstab Personen und Umwelt stark belastet. Mit Hilfe einer Extraktion im Säulenverfahren (vgl. II.9.1.2) wurde versucht, eine effektivere Extraktion des Mycels und eine Reduzierung der verbrauchten Lösungsmittelmenge zu erreichen.
Ein Vergleich beider Extraktionsmethoden mit gleichen Mycelproben erbrachte bei der Säulenextraktion eine Steigerung der extrahierten Phenazinmenge um 100 %, bei einer starken Reduzierung der verwendeten Lösungsmittelmenge.

Der nach der Säulenextraktion gewonnene Mycelrohextrakt I wurde bis zur wässrigen Phase einrotiert und mit Essigester bei saurem pH-Wert ausgeschüttelt. Hierbei gingen die Phenazine in die organische Phase. Nach dem Einrotieren dieser Phase wurde die Extraktmenge bestimmt. In einem Eiswasserbad wurde zu diesem Rohextrakt langsam Petrolether zupipettiert. Der ganze Ansatz blieb über Nacht bei $4^{\circ}C$ stehen. Vor allem Fette und Öle konnten durch diese Petroletherfällung entfernt werden. Die Menge des Essigesterextraktes reduzierte sich so um 30 %. Dieser Rohextrakt wurde Mycelrohextrakt II genannt.

4.2 Säulenchromatographie

Mit Hilfe der Flash-Chromatographie konnte der erhaltene Mycelrohextrakt II sehr schnell und schonend in mehrere Hauptfraktionen getrennt werden. Mit den verwendeten Säulen war die Aufreinigung folgender Mengen möglich: auf Säule I bis zu 2 g, auf Säule II bis maximal 25 g.
Bei der Elution der Phenazine mit den Lösungsmitteln A-D (vgl.II. 9.3.1) konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

A: Mit dem Lösungsmittelgemisch Aceton/Hexan (10:4) konnten gelb und rotgefärbte Phenazine eluiert werden. Die intensiv grün gefärbten Esmeraldine liefen unter diesen Elutionsbedingungen bis an die Grenze von Kieselgel 1 und 2.

B: Mit reinem Dichlormethan konnten alle gelb gefärbten Phenazine vollständig eluiert und die Säule gespült werden. Die Esmeraldine blieben an der Kieselgelgrenze liegen.

C: ($CHCl_2$/MeOH 9:1): Unter diesen Bedingungen konnte die Esmeraldinbande konzentriert werden. Zu einer Elution kam es nicht.

D: Erst nach dem Zusatz von 0,1 % Ameisensäure konnten die Esmeraldine als scharf begrenzte,intensiv grün gefärbte Bande vollständig eluiert werden.

Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-Analytik untersucht und nach Ähnlichkeit vereinigt und einrotiert.
Zur weiteren Aufreinigung wurden nur esmeraldinhaltige Fraktionen verwendet. Bei der anschließenden Reinigung über Präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie konnten bei jedem Lauf Proben von maximal 4 ml (= 200 mg Extrakt) aufgespritzt und getrennt werden. Mit der durchgeführten Gradientenelution wurde der eingesetzte Extrakt in zahlreiche gelb und in ein bis zwei intensiv grün gefärbte Fraktionen getrennt.
Mittels Ausschlußchromatographie an Sephadex LH 20 konnte aus diesen grünen esmeraldinhaltigen Fraktionen Esmeraldin B als Reinsubstanz erhalten werden. Durch die Aufreinigung von gelb gefärbten Fraktionen konnten weitere Phenazine isoliert werden.

Abbildung 17 zeigt die schematische Darstellung der Aufarbeitung

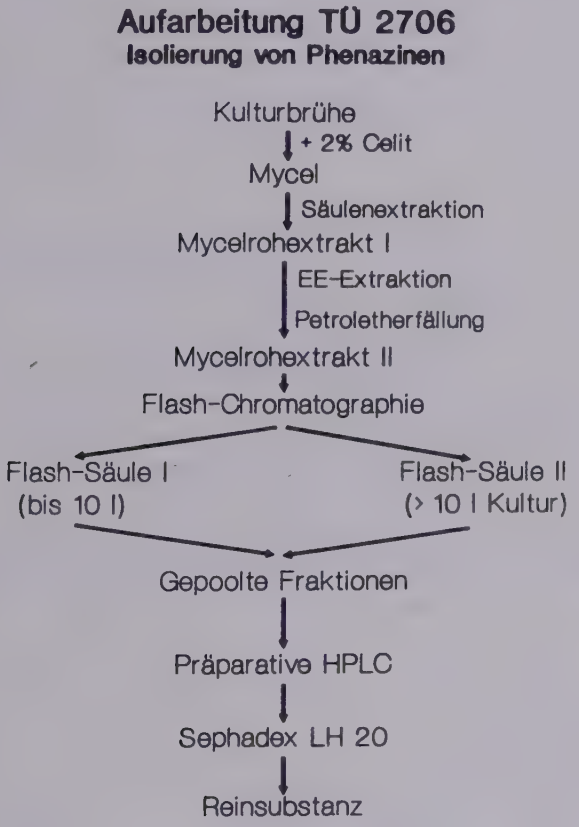
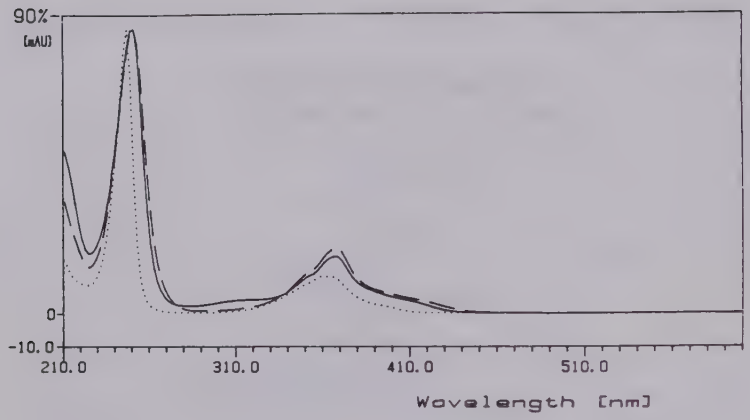


Abbildung 17: Aufarbeitungsschema von TÜ 2706.

5. Physikalisch-chemische Charakterisierung

5.1 UV/VIS-Spektroskopie

Abbildung 18 zeigt die UV/VIS-Spektren der drei Phenazine Phenazin, Saphensäure und Saphenamycin, mit den für alle Phenazine charakteristischen Absorptionsmaxima bei 254 und 369 nm.



Saphenamycin (S 6) .... Phenazin (S 1)

---- Saphensäure (S 3)

Abbildung 18: UV/VIS-Spektren von Phenazin (S 1), Saphensäure (S 3) und Saphenamycin (S 6) in MeOH.

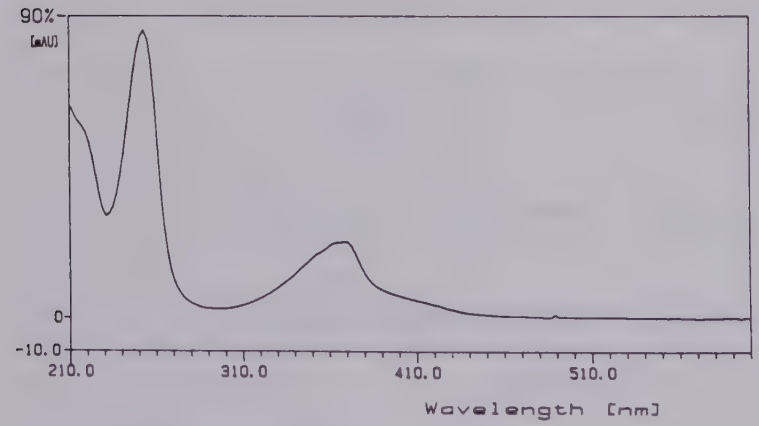


Abbildung 19: UV/VIS-Spektrum einer unbekannten isolierten Substanz in MeOH.

Das in der Abbildung 19 dargestellte UV/VIS-Spektrum weist die für die Phenazine charakteristischen Maxima auf. Es zeigt das Spektrum einer bislang noch nicht isolierten Substanz, die bei der Aufarbeitung der Esmeraldine erstmals im HPLC-Chromatogramm bei einer Retentionszeit von 5,84 min. auftauchte. Mit großer Wahrscheinlichkeit gehört diese unbekannte Substanz zur Verwandtschaftsgruppe der Phenazine.

5.2 Infrarot-Spektroskopie

In Abbildung 20 ist das IR-Spektrum von S 6 (Saphenamycin) dargestellt (vgl. auch Spektrum bei KITAHARA, 1982).
Die Absorptionsbanden zwischen 2600 und 3000 cm^{-1} deuten auf CH- und OH-Valenzschwingungen hin, die für Carbonsäuren charakteristisch sind. Im Fingerprintbereich zwischen 650 und 1400 cm^{-1} weist die Absorptionsbande bei 780 cm^{-1} möglicherweise auf einen disubstituierten Benzolring hin (NEUMÜLLER, 1977).

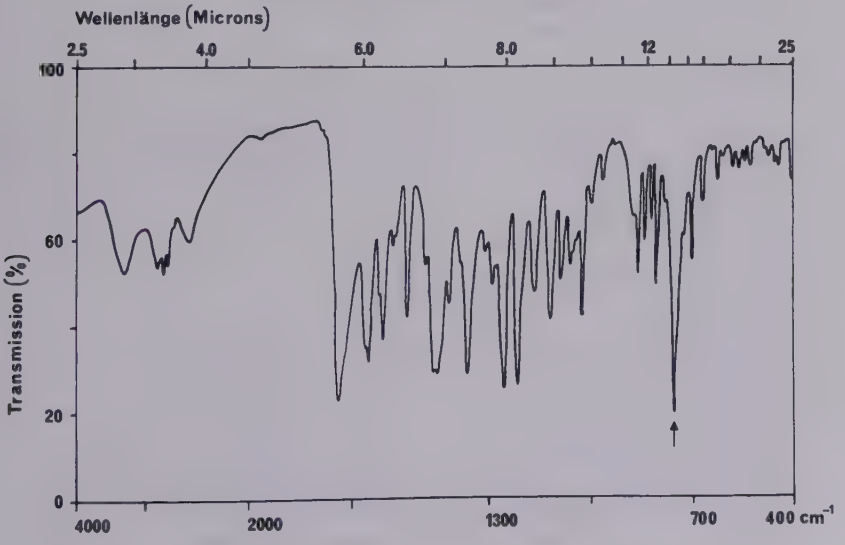


Abbildung 20: IR-Spektrum von Saphenamycin (S 6) in KBr.

6. Biologische Charakterisierung

Alle aus TÜ 2706 isolierten und chemisch synthetisierten Phenazine (siehe Abbildungen 1 und 2) wurden auf ihre biologische Aktivität untersucht. Im Wirkungsspektrum konnte die antibakterielle und antifungische Aktivität bestimmt werden. Mit Hilfe von Biophotometerversuchen sollte überprüft werden, ob die Wirkung gegen Mikroorganismen durch Diffusionsprobleme beeinflußt wurde. Im Test gegen den Nematoden Caenorhabditis elegans (N2) und die Tumorzellinie CCRF/CEM konnte der Einfluß der Phenazine auf eukaryontische Zellen untersucht werden.

6.1 Wirkungsspektrum

In den Tabellen 8 und 9 wurden alle Ergebnisse aufgelistet, bei denen die ermittelten Hemmhöfe bei einer Metabolitkonzentration von 100 µg/ml größer als 10 mm waren. Überschritten die Hemmhofdurchmesser 20 mm wurden die MHK-Werte bestimmt.

Tabelle 7:

Metabolit	Abgekürzt in den Tabellen 8 und 9 mit
SS 4 Toluylat	1
SS 4 Toluylat-Ethylester	2
SS 4 Benzoat	3
SS 4 p-Brom-Benzoat	4
SS 4 6-Methylsalicylsäure Methylether A	5
SS 4 Salicylat	6
SS 4 Butyrat	7
SS 4 Caprylat	8
SS 4 Oleat	9
S 3 Acetat	10
S 6 (Saphenamycin)	11
Saphenamycinmethylether	12

Von allen getesteten Metaboliten (Abb. 1 und 2) zeigten nur die in Tabelle 7 mit den Nummern 1-12 abgekürzten Substanzen eine Wirkung gegen Mikroorganismen.

Tabelle 8: Wirkungstest aller isolierten und synthetisierten Phenazine
MHK-Werte in µg/ml, in Klammern die Hemmhofdurchmesser bei 100 µg/ml

Testkeime:	Phenazine 1	2	3	4	5	6
Arthrobacter aurescens	0,074(30)	-	- (13)	1,96 (28)	- (11)	
Bacillus brevis α	- (17)	-	-	- (20)	-	0,02 (30)
Bacillus cereus	0,1 (27)	-	- (15)	0,01 (25)	- (15)	0,003(30)
Bacillus cereus α	0,21 (30)	-	- (18)	0,006(36)	-	<0,1 (40)
Bacillus subtilis	- (11)	-	-	- (15)	-	- (19)
Bacillus subtilis α	0,68 (37)	-	- (14)	<0,1 (36)	-	0,079(44)
Brevibacterium flavum	- (16)	-	-	- (18)	- (17)	0,17 (21)
Corynebacterium rathayi	- (14)	-	-	- (15)	-	<0,001(22)
Corynebacterium glutamicum	-	-	-	- (15)	-	<0,001(21)
Staph.aureus Rosenbach	-	-	-	- (16)	-	>1 (21)
Staph.aureus Cowan	-	-	-	-	-	-
Str.glaucescens TÜ 49	0,16 (20)	-	- (13)	- (14)	-	0,22 (20)
Str.viridochrom. TÜ 57	- (15)	-	- (9)	- (13)	-	0,13 (20)
Proteus mirabilis	0,002(29)	-	0,53 (21)	<0,001(24)	-	<0,001(30)
Proteus vulgaris	0,5 (25)	-	- (13)	0,5 (23)	-	<0,001(27)
Vibrio	0,059(22)	-	- (12)	0,027(22)	-	<0,11 (28)
Xanthomonas campestris	<0,001(40)	- (15)	<0,01 (25)	<0,001(42)	<0,01 (22)	<0,001(31)
Sordaria macrospora	-	-	-	- (17)	-	0,742(26)
Hansenula anomala	-	-	-	- (15)	-	>1 (30)

Tabelle 9: Wirkungstest aller isolierten und synthetisierten Phenazine
MHK-Werte in µg/ml, in Klammern die Hemmhofdurchmesser bei 100 µg/ml

Testkeime:	Phenazine 7	8	9	10	11	12
Arthrobacter aurescens	<1 (23)	0,9 (23)	- (18)	<1 (24)	0,75 (25)	<1 (25)
Bacillus brevis α	0,02 (31)	- (12)	- (17)	0,009 (41)	0,01 (31)	0,1 (25)
Bacillus cereus	<0,1 (26)	- (13)	- (14)	0,01 (25)	0,07 (27)	0,003(27)
Bacillus cereus α	- (18)	- (14)	- (14)	- (18)	<0,009(40)	0,2 (30)
Bacillus subtilis	-	-	-	- (18)	0,1 (20)	>1 (20)
Bacillus subtilis α	- (11)	- (12)	- (14)	- (18)	<0,001(37)	<0,001(34)
Brevibacterium flavum	-	-	-	- (14)	0,04 (23)	- (17)
Corynebacterium rathayi	-	-	-	- (15)	-	>2,8 (20)
Corynebacterium glutamicum	-	-	-	-	0,2 (23)	- (18)
Staph.aureus Rosenbach	-	-	-	-	1 (24)	>1 (20)
Staph.aureus Cowan	-	-	-	-	1 (21)	-
Str.glaucescens TÜ 49	0,51 (26)	-	- (14)	0,15 (29)	- (17)	0,3 (22)
Str.viridochrom. TÜ 57	- (17)	-	-	- (17)	0,35 (20)	- (17)
Proteus mirabilis	0,001(28)	-	- (14)	0,003 (29)	<0,01 (27)	0,6 1(25)
Proteus vulgaris	0,5 (24)	- (12)	- (12)	0,5 (25)	0,005(26)	<0,5 (24)
Vibrio	<0,001(30)	-	-	-	- (13)	-
Xanthomonas campestris	<0,001(40)	<0,001(37)	<0,001(32)	<0,001 (39)	<0,001(46)	<0,001(40)
Sordaria macrospora	-	-	-	-	>1 (26)	-
Hansenula anomala	-	-	-	-	>1 (30)	-

Diese Wirkung beschränkte sich weitgehend auf Gram$^+$ Bakterien. Lediglich bei Proteus mirabilis, P. vulgaris, Vibrio und Xanthomonas campestris konnte auch bei Gram$^-$ Testkeimen eine antibakterielle Wirkung und bei Sordaria und Hansenula eine antifungische Aktivität festgestellt werden.
Die aktivsten Metabolite mit der größten Wirkungsbreite und den niedrigsten MHK-Werten (meist <0,1 µg/ml) stellten die Metabolite SS 4 Saliyclat, S6 und Saphenamycinmethylether dar. Es zeigten alle Ester der Saphensäure eine antibakterielle Wirkung, wobei die mit einem Aromaten oder einem substituierten Aromaten veresterten Substanzen am aktivsten waren.

6.2 Biophotometerversuche

Alle im Wirkungsspektrum untersuchten Metabolite wurden zusätzlich im Biophotometer in Flüssigkultur auf ihre biologische Aktivität gegen Mikroorganismen getestet. Als empfindlicher Testorganismus wurde Bacillus cereus gewählt (vgl. III.6.1).

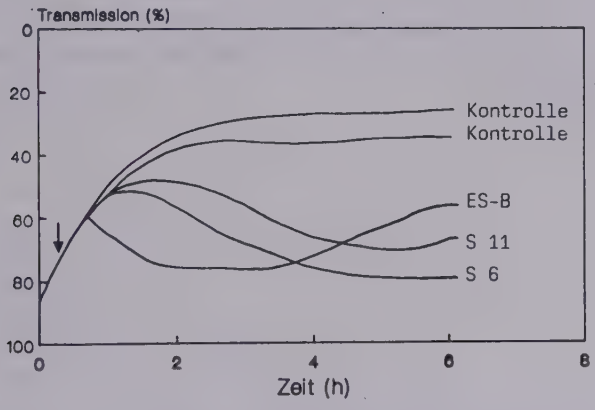


Abbildung 21: Wirkung verschiedener aus TÜ 2706 isolierter Phenazinderivate auf das Wachstum von Bacillus cereus in Flüssigkultur. Der Pfeil kennzeichnet den Zugabezeitpunkt der Metabolite (Metabolitendkonzentration: 100 µg/ml).

Bei den aus TÜ 2706 isolierten Phenazinderivaten konnte für die Metabolite S 6, S 7 , S 11 und ES-B eine bakterizide Wirkung festgestellt werden, was sich an der Zunahme der Transmission bemerkbar machte. S 6 war hierbei am aktivsten. Die Substanzen S3 und S 3 Palmitat zeigten einen schwachen bakteriostatischen Effekt.
Von den synthetisierten Phenazinen waren SS 4 Salicylat stark und SS 4 Caprylat, SS 4 Butyrat, SS 4 Cap I und Saphenamycinmethylether schwach bakterizid wirksam. Eine bakteriostatische Wirkung konnte bei SS 4 Toluylat-Ethylester, SS 4 6-Methylsalicylsäure Methylether A und SS 4 Oleat festgestellt werden.

6.3 Test gegen Caenorhabditis elegans

In der Tabelle 10 sind die Ergebnisse dieses Tests dargestellt. Bis auf die Metabolite S 7 und S 8 zeigten alle Phenazinderivate einen Einfluß auf die Nematoden. Meist war die Beweglichkeit etwas eingeschränkt und die Anzahl der vitalen Würmer reduziert. Am aktivsten war S 6, bei dieser Substanz war die Beweglichkeit stark reduziert und alle Würmer tot. Bei den Metaboliten Phenazin, S 3, ES-B, ES-A-Methylderivat und Saphenamycinmethylether konnten sehr viele tote und in ihrer Beweglichkeit stark verlangsamte Nematoden festgestellt werden.

Tabelle 10: Test einiger Phenazinderivate gegen Caenorhabditis elegans.

Metabolit	Beweglichkeit	Vitalität
Phenazin:	--	+++
S 2 (SS 3):	--	++(+)
S 3 (SS 4):	--	+++
S 6:	--	+++
S 7:	0	0
S 8:	-	0
ES-A:	-	++
ES-B:	--	+++
SS 4 Toluylat:	-	++(+)
SS 4 Toluylat-Ethylester:	-	++
SS 4 Benzoat:	-	++
SS 4 p-Brom-Benzoat:	-	++
SS 4 6-Methylsalicylsr. : Methylether A	-	++(+)
SS 4 Ethylester:	-	++(+)
SS 4 Salicylat:	-	+++
SS 4 Caprylat:	-	++
SS 4 Oleat:	-	+++
SS 4 Palmitat:	-	+++
S 3 Acetat:	-	+++
ES-A Methylderivat:	--	+++
Saphenamycinmethylether:	--	+++

(-: langsam, --: sehr langsam, ++: einige Tote, ++(+): viele Tote +++: fast alle tot, ++++: alle tot, 0: entspricht Kontrolle)

6.4 Test auf cytostatische Aktivität

6.4.1 Vortest auf cytostatische Aktivität

Mit dem Vortest auf cytostatische Aktivität gegen eine CCRF/CEM-Zellinie konnte man einen Teil der untersuchten Phenazine für weitere Untersuchungen ausschließen. Alle Metabolite, die in diesem Test Überlebensraten unter 80 % aufwiesen, schienen für weitere Untersuchungen interessant (DIDDENS, 1986).

6.4.1.1 Test der aus Tü 2706 isolierten Phenazine

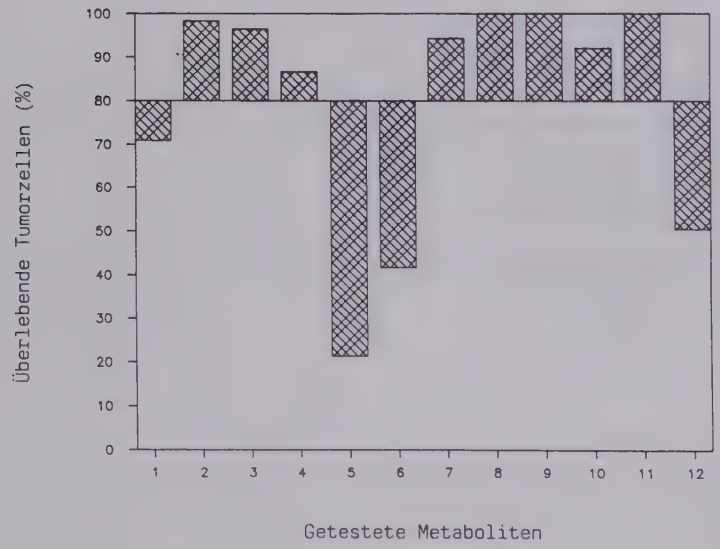


Abbildung 22: Überlebensraten (in %) der Tumorzellen nach der Inkubation mit Phenazinen aus TÜ 2706.

Getestete Metabolite:

1: Phenazin, 2: S 2, 3: S 3, 4: S 3 Palmitat, 5: S 6 (Saphenamycin), 6: S 7, 7: S 8, 9: S 10, 10: S 11, 11: ES-A, 12: ES-B.

In einem ersten Test sollten alle aus TÜ 2706 isolierten Phenazine auf ihre cytostatische Aktivität untersucht werden. Die Metabolite wurden hierzu in einer Konzentration (10 µg/ml) gegen eine CCRF/CEM-Tumorzellinie eingesetzt, die aus dem peripheren Blut einer Patientin mit akuter lymphatischer Leukämie isoliert werden konnte.

Nach 48 h Inkubation wurden die Titer der verschiedenen Ansätze mit dem Coulter counter bestimmt.

6.4.1.2 Test der synthetisierten Phenazine

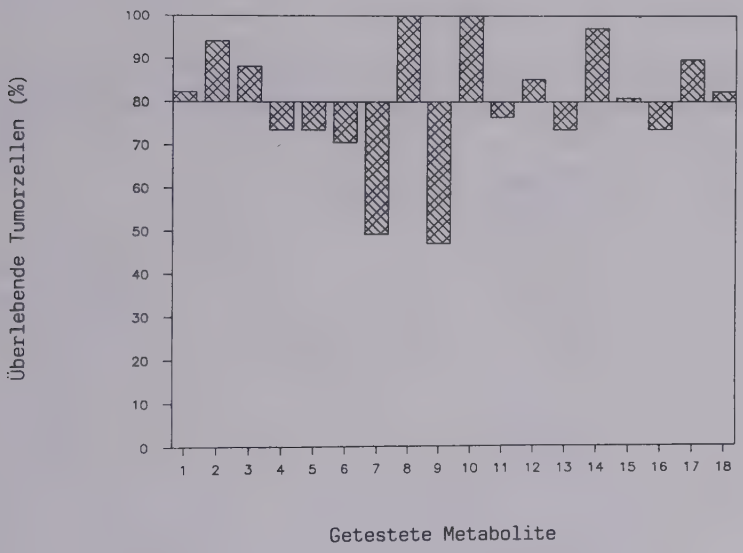


Abbildung 23: Überlebensraten (in %) der Tumorzellen nach 48 h Inkubation mit synthetisierten Phenazinen.

Getestete Metabolite, synthetisiert:

1: SS 4, 2:SS 3, 3: SS 4 Toluylat, 4: SS 4 Toluylat-Ethylester, 5: SS 4 Benzoat, 6: SS 4 p-Brom-Benzoat, 7: SS 4 6-Methylsalicylsäu-

re-Methylether A, 8: SS 4 Ethylester, 9: SS 4 Salicylat, 10: SS 2, 11: SS 4 Cap I, 12: SS 4 Butyrat, 13: SS 4 Caprylat, 14: SS 4 Oleat, 15: SS 4 Palmitat, 16: S 3 Acetat, 17: ES-A Methylether, 18: Saphenamycinmethylether.

Die Durchführung und die Intention dieses Tests entsprach III.6.4.1.1 . Die Bestimmung der Titer erfolgte nach Anfärbung mit Trypanblau und Auszählen der Zellen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer.

Vor allem Ester der Saphensäure zeigten eine cytostatische Wirkung. Die Saphensäure und deren Vorstufen, mit Ausnahme des Phenazins, konnten als cytostatisch unwirksam angesehen werden.

6.4.2 Bestimmung der ID_{50}- Werte

6.4.2.1 Isolierte Phenazine

Die Bestimmung der ID_{50}-Werte erfolgte wie unter II.7.4 beschrieben. Getestet wurden die Metabolite Phenazin, S6 und ES-B in den Verdünnungsstufen 0.1, 1, 2, 3, 6, 10 µg/ml.

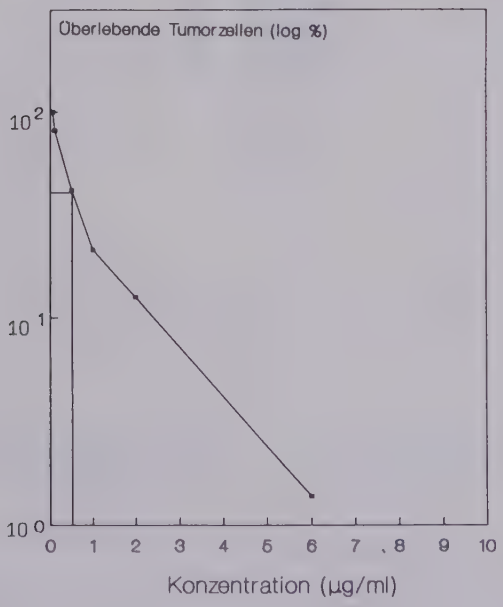


Abbildung 24: ID_{50}-Bestimmung von Saphenamycin (S 6).

Zur Ermittlung der ID_{50}-Werte wurden die Überlebensraten als Prozent des Wertes der jeweiligen Kontrolle auf halblogarithmischen Papier aufgetragen. Der ID_{50}-Wert war diejenige Metabolitkonzentration, die graphisch am 50 % Wert bestimmt werden konnte.

Für Esmeraldin B konnte ein ID_{50}-Wert von 0,4 µg/ml ermittelt werden. Bei den beiden anderen isolierten Phenazinen lagen die ID_{50}-Werte bei 0,6 µg/ml (Saphenamycin) und >20 µg/ml bei Phenazin.

6.4.2.2 Synthetisierte Phenazine

Die Bestimmung der ID_{50}-Werte bei den synthetisierten Phenazinen erfolgte entsprechend III.6.4.2.1.

Tabelle 11: ID_{50}-Bestimmung synthetisierter Phenazine.

Metabolit	ID_{50}-Wert (µg/ml)
SS 4 Toluylat-Ethylester	7,8
SS 4 Benzoat	1,3
SS 4 p-Brom-Benzoat	18
SS 4 6-Methylsalicylsäure-Methylether	8,3
SS 4 Salicylat	4,0
SS 4 Cap I	>20
SS 4 Caprylat	10
S 3 Acetat	7,4

Bei den getesteten synthetisierten Ester der Saphensäure waren vor allem die mit Aromaten veresterten Metabolite cytostatisch aktiv. SS 4 Salicylat mit seiner Hydroxygruppe zeigte eine etwas geringere Aktivität wie das isolierte Saphenaymcin mit seiner Hydroxy- und Methylgruppierung. Bei Esmeraldin B mit seinem zusätzlichen Phenazinringsystem an den C-Atomen 3 und 4 konnte mit einem ID_{50}-Wert von 0,4 µg/ml eine geringfügig bessere Aktivität wie bei Sa-

phenamycin (ID_{50}-Wert: 0,6 µg/ml) festgestellt werden. Eine gute cytostatische Aktivität zeigte auch SS 4 p-brom-Benzoat (1,3 µg/ml).

IV. DISKUSSION

1. Isolierung und Nachweis

In der vorangegangen Diplomarbeit (BRANDL, 1985) konnte gezeigt werden, daß es sich bei den von Streptomyces antibioticus (TÜ 2706) gebildeten grünen Endopigmenten (Esmeraldine) mit großer Wahrscheinlichkeit um neuartige, noch nicht beschriebene Substanzen handelt.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war deshalb die Fermentation und Isolierung dieser Metabolite. Bei der Aufarbeitung der Mycelrohextrakte fiel auf, daß neben den grünen Esmeraldinen auch zahlreiche intensiv gelb gefärbte Pigmente vorkamen. Diese gelben Pigmente waren lipophiler als die Esmeraldine. Eine Optimierung der Trennung (vgl. III.4) führte zu einer guten Abtrennung der gelben und grünen Metabolite. Die vollständige Isolierung und Reinigung einer sehr lipophilen (Rf-Wert = 0,84, Laufmittelsystem I, vgl. III.1.1) und somit leicht zu isolierenden gelben Verbindung, führte schließlich zu deren Strukturaufklärung an der ETH Zürich (Arbeitskreis Prof. Dr. W. Keller-Schierlein). GEIGER (1985) konnte diesen gelben Metaboliten als Phenazin identifizieren. Von INGRAM & BLACKWOOD wurde Phenazin 1970 als `Nucleolus´ aller bekannten Phenazinderivate beschrieben. Ein weiterer sehr lipophiler Metabolit, mit dem Arbeitsnamen S 6, konnte mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse in seiner Struktur aufgeklärt werden. Er war mit dem von KITAHARA et al. (1982) beschriebenen Saphenamycin identisch. Strukturell handelt es sich bei Saphenamycin um eine, mit einer 6-(1-Hydroxyethly-)-Phenazin-1-Carbonsäure veresterten 6-Methylsalicylsäure. Diese 6-(1-Hydroxyethyl-)-Phenazin-1-Carbonsäure wurde von TAKAHASHI et al. (1986) als DC-86-Y beschrieben; KELLER-SCHIERLEIN (1987) schlug den Namen Saphensäure vor.
Weitere Phenazinderivate, vor allem Ester der Saphensäure konnten aus dem Mycelextrakt von TÜ 2706 isoliert werden.

Die HPLC-Analytik der Phenazinderivate zeigte, daß auch Esmeraldin B unter den gleichen Bedingungen chromatographiert und detektiert werden konnte wie die Phenazine. Ein UV/VIS-Spektrum von Esmeraldin B zeigte zudem Maxima bei 254 und 369 nm, wie sie für Phenazine charakteristisch sind.
Diese für alle Phenazine gefundenen Absorptionsmaxima geben die Möglichkeit zum HPLC-Screening (FIEDLER, 1984) nach neuen Phenazinderivaten. Findet man im HPLC-Chromatogramm einen neuen peak, der keinem bislang bekannten Phenazin zuzuordnen ist (vgl. III. 5.1), so kann mit dem Photodioden-Array-Detektor sofort, ohne diesen Metaboliten isolieren zu müssen, ein UV/VIS-Spektrum aufgenommen werden. Ein Vergleich mit Spektren bekannter Phenazine zeigt, ob der neue Metabolit mit großer Wahrscheinlichkeit ein neues Phenazin ist. Endgültige Gewißheit gibt dann die Strukturaufklärung der isolierten Substanz.
GEIGER (1987) konnte die Esmeraldine schließlich als Phenazinderivate in ihrer Struktur aufklären. Beide Esmeraldine (A und B) haben den gleichen Grundkörper. Dieser Grundkörper besteht aus einer Saphensäure, an deren C-Atome 3 und 4 eine Phenazin-1-Carbonsäure gebunden ist. Die Hydroxygruppe dieses Grundkörpers ist bei Esmeraldin A mit acht verschiedenen Fettsäuren (vgl. S 7) und bei Esmeraldin B mit einer 6-Methylsalicylsäure (vgl. Saphenamycin) verestert.

Eine `CAS online Recherche´ zeigte, daß alle bekannten Phenazinderivate in ca. 11400 Reviews beschrieben sind. Es wurde versucht, über die Eingabe der Struktur der Saphensäure, einen Überblick über alle Derivate dieses Grundkörpers zu bekommen. Lediglich in 9 Arbeiten konnte dieses Strukturmerkmal gefunden werden, wobei die aus TÜ 2706 isolierten Phenazinderivate S 2, S 7 und S 11 nicht vorkamen. Diese Metabolite können somit als neue Phenazinderivate angesehen werden.
Die oben beschriebene Grundstruktur der Esmeraldine konnte in keiner zugänglichen Literatur oder veröffentlichten Patentschrift gefunden werden. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß mit den isolierten Esmeraldinen A und B zwei völlig neue Phenazinderivate beschrieben werden. Sie weisen einen bislang noch nicht be-

kannten Grundkörper auf, der aus sieben konjugierten Ringsystemen besteht, aufbauend auf dem Phenazingrundkörper.

2. Resting cell Versuche und Biogenese der Phenazine

Einige Pseudomonas-Arten bilden intra- und extrazelluläre Pigmente, von denen die Mehrzahl zu der Substanzklasse der Phenazine gehört (INGRAM & BLACKWOOD, 1970 und LEISINGER & MARGRAFF, 1979). Schon frühzeitig wurde die Struktur des Pyocyanin aus `Bacillus pyocyaneus´ (jetzt Pseudomonas aeruginosa) von WREDE & STRACK (1929) aufgeklärt. Seither wurde in regelmäßigen Abständen über das Auftreten weiterer Phenazinpigmente aus unterschiedlichen Organismen berichtet (RÖMER et al., 1981). So beschrieb UMEZAWA et al. 1950 ein neues Antibiotikum (Griseolutein A = ein Phenazinderivat) aus Streptomyces griseoluteus. In den nächsten Jahrzehnten folgten weitere Phenazine aus Streptomyceten, zum Beispiel bei MESSENGER & TURNER (1983), die die `Phenazin-1,6-Dicarbonsäure und deren Dimethylester als Precursor anderer Phenazine in Bakterien´, am Beispiel von Streptomyces thioluteus und Micromonospora amethystogenes und M. parva beschrieben. KARNETOVA et al. (1983) isolierten verschiedene Phenazine aus Streptomyces cinnamonensis (ATCC 15413). Dennoch wurden die meisten Untersuchungen zur Biogenese der Phenazine mit Pseudomonaden durchgeführt.

Rein formal kann der Phenazingrundkörper, als ein aus zwei Anthranilsäuremolekülen zusammengesetzter Metabolit angesehen werden. Auf diese Weise würde zuerst eine Phenazin-1,6-Dicarbonsäure entstehen, aus der durch zweimalige Decarboxylierung das Phenazin gebildet werden könnte.

KURACHI (1959) stellte bei Untersuchungen zur Produktionssteigerung des Pyocyanins bei Pseudomonas aeruginosa fest, daß durch die Zugabe von Anthranilsäure eine Stimulation erreicht werden konnte. So erhielt er bei der Zugabe von 1 mM Anthranilsäure eine dreifache Stimulation der Pyocyaninbildung.

LEVITCH & STADTMAN (1964) konnten mit Resting cells von Pseudomonas aeruginosa nachweisen, daß durch die Zugabe von 1 mM Anthranilsäure die Synthese der Phenazin-1-Carbonsäure vollständig gehemmt war. HOLLSTEIN und MARSHALL (1972) bestätigten dieses Ergebnis. Sie formulierten zwei mögliche Gründe für die Hemmung der Phenazinsynthese nach der Verfütterung von Anthranilsäure: 1. Anthranilsäure kann nur schlecht durch die Zellwand in die Zelle transportiert werden, oder 2. Phenazine werden aus einem Precursor der Anthranilsäure gebildet, dessen Bildung einer Feedback-Regulation durch überschüßige Anthranilsäure unterliegt.

Bei den mit TÜ 2706 durchgeführten Verfütterungsversuchen im Resting cell Verfahren konnte bei der Verfütterung von Anthranilsäure mit Konzentrationen ab 1 mM eine zunehmende Hemmung der Phenazinsynthese festgestellt werden. Mit Hilfe der HPLC-Analytik (gleiche Parameter, wie für die Phenazine) konnte in den extrahierten Zellen Anthranilsäure nachgewiesen werden. Ein schlechter Transport von Anthranilsäure durch die Zellwand, als Erklärung für die fehlende Stimulation bei Anthranilsäureverfütterungen, wird somit unwahrscheinlich. Die zunehmende Hemmung der Phenazinbildung durch steigende Anthranilsäurekonzentrationen deutet vielmehr auf eine Feedback-Regulation durch überschüßige Anthranilsäure hin.

Bei der Verfütterung weiterer aromatischer Vorstufen erkannten INGLEDEW & CAMPBELL (1969), daß die meisten dieser Metabolite exzellente Substrate für das Wachstum von Pseudomonas aeruginosa darstellten. So war bei vielen Untersuchungen der Phenazinbiosynthese die Trennung von Tropho- und Idiophase, und somit die Arbeit mit Resting cells, nicht durchgeführt worden. Lediglich GROSSOWICZ et al. (1957) und LEVITCH & STADTMAN (1964) achteten in ihren Versuchen auf diese Trennung. Die zu den wachsenden Kulturen als mögliche Vorstufen zugegebenen Metabolite wurden für den Energiestoffwechsel und die Zellsynthese verbraucht. So konnten sie nicht speziell in die Pigmentbildung eingeschleust werden.
INGLEDEW & CAMPBELL (1969) und MAC DONALD (1963), die Verfütterungsversuche mit ^{14}C markierten Vorstufen an verschiedenen Stoffwechselmutanten von P. aeruginosa durchführten, konnten zeigen,

daß Shikimisäure als bevorzugte Vorstufe des Pyocyanin anzusehen ist (CALHOUN et al., 1972). Auch bei der Synthese anderer Phenazine konnte ein Einbau der radioaktiv markierten Shikimisäure nachgewiesen werden (HERBERT et al., 1974, HOLLSTEIN & MARSHALL, 1972 und BYNG & TURNER, 1977), wobei alle C-Atome dieser Vorstufe im Phenazingrundgerüst wiedergefunden werden konnten.
Die Verfütterung von radioaktiv markiertem Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan brachte keinen meßbaren Einbau in die Phenazine und keine Stimulation der Phenazinbildung.
Bei der Verfütterung von Shikimisäure an TÜ 2706 konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. So wurde bei einer Konzentration von 5 mM die Produktion von ES-B um 70 % stimuliert. Unter der Voraussetzung, daß Shikimisäure in Esmeraldin B eingebaut wird und der Esmeraldin B-Grundkörper sich aus vier Shikimisäurebausteinen aufbaut, kann für die verfütterte Shikimisäure ein Einbau von ca. 3-4 % errechnet werden.
Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Verfütterungsversuchen mit Pseudomonaden konnte bei der Verfütterung von Tyrosin an Streptomyces antibioticus (TÜ 2706) eine deutliche Stimulation (125 %) auf alle untersuchten Phenazine festgestellt werden. Bei 2 und 5 mM wurde Saphenamycin und bei 1 mM Esmeraldin B am besten produziert. Den gleichen Effekt, wie bei den Shikimisäureverfütterungen, hatte die Zugabe von Tyrosin in Konzentrationen über 5 mM. Bei diesen Konzentrationen konnte keine weitere Stimulation mehr beobachtet werden, der Phenazinstoffwechsel war vielmehr gehemmt. Nach der Zugabe von 10 mM Tyrosin konnten keine Phenazine mehr nachgewiesen werden.

Bei Untersuchungen zur Regulation der Biosynthese aromatischer Aminosäuren von Streptomyceten gibt es bei verschiedenen Streptomycetenstämmen unterschiedliche Ergebnisse (OCHS, 1987). So konnten GÖRISCH & LINGENS (1971) bei Streptomyces aureofaciens TÜ 24 eine Inhibition der DAHP-Synthetase durch Tryptophan feststellen, während LOWE & WESTLAKE (1971) bei Streptomyces sp. 3022 mit keinem Zwischen- oder Endprodukt der Biosynthese eine Feedback-Hemmung dieses Enzyms fanden. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Streptomycetenstamm (TÜ 2706) scheint der Biosyntheseweg der Aro-

maten jedoch durch Tyrosin reguliert zu sein. Als Hinweis hierfür ist die beobachtete Stimulation bei verfütterten Tyrosinkonzentrationen bis 5 mM und die Hemmung der Phenazinsynthese bei Konzentrationen über 10 mM anzusehen. Mit dem von HAGINO & NAKAYAMA (1975) und OMURA (1984) für Corynebacterium glutamicum und Streptomyces griseus beschriebenen Modell zur Regulation der Synthese aromatischer Aminosäuren kann diese Regulation durch Tyrosin erklärt werden.
Die Zugabe niedriger Konzentrationen Tyrosin (bis 5 mM) könnte auf die Chorismatmutase eine Feedback-Hemmung ausüben. Dadurch müßte es zu einem verstärkten Umsatz der Metabolite in Richtung Anthranilsäure und Phenazine kommen. Durch die Verfütterung von ^{14}C-markiertem Tyrosin könnte diese Vermutung bewiesen werden. Bekommt man durch die Zugabe dieses markierten Metaboliten eine Stimulation der Phenazinbildung, aber keinen Einbau von ^{14}C im Phenazingerüst, dann müßte Tyrosin über den beschriebenen regulatorischen Effekt stimulierend wirken. Beim Einbau von radioaktivem ^{14}C in die Phenazine wäre Tyrosin dann gewissermaßen eine Vorstufe. Bei Tyrosinkonzentrationen über 5 mM könnte die Feedback-Hemmung auf der Stufe der DAHP-Synthetase liegen. Zu hohe Konzentrationen an Tyrosin würden somit den ganzen Stoffwechselweg für Aromaten abschalten.

Diese Regulation kann durch die Herstellung von analogresistenten Mutanten umgangen werden. Mit Hilfe von m-Fluor-Tyrosin in einer sehr hohen Konzentration (10 mg/ml) konnten analogresistente Mutanten von TÜ 2706 isoliert werden. Alle anderen getesteten Antimetabolite zeigten keine Wirkung. Ähnliche Ergebnisse hatten auch ALVARADO (1987) und OCHS (1987) bekommen. Möglicherweise handelt es sich hier um ein bei Streptomyceten verbreitetes Phänomen.

Beim Test der erhaltenen analogresistenten Mutanten konnte durch die Verfütterung von 20 mM Tyrosin nachgewiesen werden, daß die Regulation der Phenazinbildung aufgehoben war. Der Wildtyp hingegen zeigte in seinem Phenazinstoffwechsel bei dieser Tyrosinkonzentration eine vollständige Hemmung.

Bei der Verfütterung von 20 mM Anthranilsäure war der Phenazinstoffwechsel bei allen getesteten Mutanten, einschließlich des Wildtyps, vollständig gehemmt. Hierfür könnte es zwei Erklärungen geben: 1. bei der DAHP-Synthetase handelt es sich um ein Isoenzym. Um eine Feedback-Regulation durch Anthranilsäure aufzuheben, müßte man mit Anthranilsäureanaloga spezielle analogresistente Mutanten suchen, oder 2. überschüßige Anthranilsäure hemmt die Bildung seines eigenen Precursors (HOLLSTEIN & MARSHALL, 1972).

Eine durchgeführte Verfütterung verschiedener Metalle hatte gezeigt, daß nach der Zugabe von 5 mM $MgCl_2$ Ausbeutesteigerungen bis 600 % erzielt werden konnten. SUGIMOTO & SHIIO (1985) konnten bei Brevibacterium flavum nachweisen, daß für die Reaktion der Sikimatkinase (katalysiert die Phosphorylierung von Shikimisäure) Mg^{2+}-Ionen notwendig sind. Möglicherweise kann bei TÜ 2706 durch das verfütterte $MgCl_2$ die Shikimatkinase auch stimuliert werden, was sich anschließend dann in einem verstärkten Phenazinstoffwechsel auswirkt. Konzentrationen über 5 mM, die bei den Versuchen keine Stimulation mehr bewirkten, sind für den Organismus wahrscheinlich toxisch.

Im Syntheseweg der Phenazine scheint der Shikimisäure und der Chorismsäure eine besondere Bedeutung als Verzweigungspunkt zuzukommen (CALHOUN et al., 1972). Bei allen Untersuchungen konnte bislang noch nicht vollständig geklärt werden, ob der Phenazingrundkörper direkt aus zwei Shikimisäuremolekülen, oder über Chorismsäure entsteht. Die zuvor beschriebenen Regulationsmöglichkeiten mit Tyrosin deuten bei TÜ 2706 aber auf einen Syntheseweg hin, der über die Chorismsäure geht, ohne die Beteiligung von Anthranilsäure.
Ausgangspunkt für die Synthese der zahlreichen beschriebenen Phenazinderivate ist nach MESSENGER & TURNER (1983), bei Streptomyceten, die Phenazin-1,6-Dicarbonsäure (vgl. formale Betrachtung der Phenazine). Mit der aus TÜ 2706 isolierten Phenazin-1-Carbonsäure (S 9), einem Decarboxylierungsprodukt dieser Phenazindicarbonsäure, findet sich auch in der vorliegenden Arbeit ein Hinweis für diesen Syntheseweg.

Fast alle Metabolite aus TÜ 2706 stellen Ester der Saphensäure dar, über deren Synthese bei Mikroorganismen bislang noch nichts beschrieben ist.
Zwei denkbare Wege wären die Synthese der Phenazin-1-Carbonsäure und anschließende Ausbildung des 1-Hydroxyethylteils am C-Atom 6 des Phenazingerüsts, oder die vollständige de novo Synthese aus zwei entsprechenden Bausteinen. Einer dieser Bausteine wäre dann nach der oben beschriebenen Phenazinbiosynthese wahrscheinlich die Shikimi- oder die Chorisminsäure.

Versuche in dieser Richtung wurden mit der Verfütterung verschiedener α-Ketosäuren unternommen. So konnte durch die Zugabe von Trimethylpyruvat eine deutliche Steigerung der Phenazinbildung erreicht werden. Eine Bindung an die Phenazin-1-Carbonsäure und nachfolgende Decarboxylierung und Demethylierung wären denkbare Schritte zur Saphensäure.

Alle Versuche zum Verständnis und zur gezielten Biosynthese der Phenazinderivate aus TÜ 2706 wurden im Resting cell Verfahren durchgeführt. Die Vorteile dieser Methode wurden im Ergebnisteil ausführlich beschrieben und ergeben sich auch aus der oben zitierten Literatur.
Ein wichtiger Punkt bei derartigen Arbeiten ist jedoch die Optimierung des Verfahrens, worunter man z.B. das Alter der Vorkulturen und die Mediumzusammensetzung versteht.
WALZ (1986) beschreibt mit seinen Arbeiten an Streptomyces tendae die gleichen Beobachtungen, wie sie schon DEMAIN & KENNEL (1978) bei ihren Untersuchungen zur ß-Lactam-Biosynthese bei Cephalosporium machten. Sie erzielten mit Zellen aus der frühen exponentiellen Phase die höchsten Produktionsraten. Für die Produktion von Phenazinen konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden. TÜ 2706 zeigte die beste Produktion mit Zellen, die sich am Beginn der Idiophase befanden. Wahrscheinlich müssen zuerst alle für den Zellstoffwechsel notwendigen aromatischen Aminosäuren gebildet werden und erst dann kann der Stamm Vorstufen in die Phenazinbildung einschleusen.

Anorganisches Phosphat im Kulturmedium fördert meist das Wachstum von Pro- und Eukaryonten (CRUEGER & CRUEGER, 1982). Bei zahlreichen Systemen liegt die Konzentration an Phosphat, bei der Sekundärmetaboliten noch gebildet werden, unter 1 mM. MARTIN (1977) beschreibt einige Antibiotika, die auch bei höheren P_i-Konzentrationen noch gut gebildet werden. Als Beispiel wären hier die Actinomycine zu nennen, deren Bildung zwischen 1,4 und 17 mM Phosphat noch möglich ist. Actinomycine werden auch über den Stoffwechselweg für aromatische Aminosäuren synthetisiert, der Phenoxazinon-Grundkörper entsteht aus Tryptophan.
Die Produktion der Phenazine wurde durch 5 mM Phosphat im Resting cell Medium nicht beeinträchtigt. Mit niedrigeren Konzentrationen konnten keine besseren Ausbeuten erzielt werden, höhere Konzentrationen wurden nicht getestet. Die Phenazinbildung bei TÜ 2706 scheint ebenso, wie die oben beschriebene Actinomycinbildung, durch anorganisches Phoshat wenig beeinflußt zu sein.

3. Fermentationen im 10 l Maßstab

Alle im 10 l Maßstab durchgeführten Fermentationen wurden unter zwei Gesichtspunkten durchgeführt: 1. Bereitstellung von Phenazinen für Untersuchungen zur Strukturaufklärung und Wirkungsweise. 2. Übertragung der im Kolbenmaßstab mit Resting cell Kulturen erzielten Ausbeutesteigerungen. Dies stellt einen ersten Schritt für das `scale up´ des Verfahrens dar.

Um Biomasse für die Fermentationen im Resting cell Verfahren zu bekommen, mußte zuerst eine optimierte Batch Fermentation entwikkelt werden. Hierbei konnte im Wesentlichen auf die in der Diplomarbeit (BRANDL, 1985) ermittelten Parameter zurückgegriffen werden. Auf die empirische Optimierung von Fermentationsparametern wie Alter der Vorkulturen, Animpfdichte, Drehzahl, Belüftung, Temperatur und pH-Wert (vgl. auch HÄSLER, 1987) soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden.
Bei den Fermentationen konnte gezeigt werden, daß unter der Berücksichtigung von Verdünnungseffekten, bei Verfütterungs- und

Cross Flow-Versuchen, die gemessenen Parameter gut mit der Phenazinproduktion korrelierten. Der Verlauf des pH-Wertes zeigte bei allen Fermentationen keine großen Schwankungen.

Mit der Verfütterung von Tyrosin und Shikimisäure bei Fermentationen in Medium 13 konnten gute Ausbeutesteigerungen erzielt und somit erste Erfolge beim scale up erreicht werden.

Mit der durchgeführten Cross Flow Fermentation sollten Resting cell-Bedingungen im 10 l Fermenter hergestellt werden. Aus technischen Gründen konnte jedoch das komplexe Wachstumsmedium 13 nicht vollständig entfernt werden, weil einerseits die Kulturbrühe zu viskos und andererseits der Druck in der Cross Flow Apparatur zu hoch wurde. Es konnten lediglich 5 l Medium 13 durch 7 l Medium 20 ausgetauscht werden. Die erzielten Ausbeuten an Phenazinen lagen unter den im normalen Batch Verfahren mit Medium 13 erzielten Werten, gleichzeitig blieben die von den Kolbenversuchen her erwarteten Stimulationen des Phenazinstoffwechsels aus.

Cross Flow Filtrationen wurden bisher weitgehend für die Isolierung und Reinigung von Metaboliten verwendet (BELL & DAVIES (1987) und GRABOSCH (1987)). Durch die fortschreitende Entwicklung dieser Techniken können bei der Aufarbeitung empfindlicher Verbindungen Fermentationsmedien ohne starke Scherbelastung in einzelne Fraktionen zerlegt werden.

Für die Durchführung von Cross Flow Fermentationen, wie sie mit TÜ 2706 durchgeführt wurden, gibt es bislang noch wenig Erfahrung. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Zellen bei der Abtrennung des komplexen Wachstumsmediums geschädigt wurden und hier der Grund für die schlechte Produktion zu suchen ist. Bei der Untersuchung des Metabolitenmusters konnte eine Reduzierung der Metabolite auf Phenazinderivate festgestellt werden. Fermentationen im Cross Flow Verfahren scheinen somit der richtige Weg für die Produktion der Phenazine im Fermenter-Maßstab zu sein. Eine weitere Optimierung dieses Methode scheint sinnvoll.

4. Wirkungsweise

Die unter IV.1 genannte große Anzahl an Reviews, in denen Phenazinderivate beschrieben werden und die in der Einleitung aufgeführten Artikel, lassen vermuten, daß auch zur biologischen Wirkung von Phenazinen zahlreiche Arbeiten erschienen sind. Die durchgeführte Literaturrecherche zeigte, daß es zu den verschiedensten Phenazinderivaten vielfältige biologische Aktivitäten gibt. Am Beispiel von drei Arbeiten soll gezeigt werden, über welches Spektrum sich diese Aktivitäten ausbreiten.

Schon WREDE und STRACK (1929) konnten zeigen, daß das von ihnen isolierte und beschriebene Pyocyanin antimikrobiell aktiv ist. YAGISHITA (1960) diskutierte einen schwachen Antitumoreffekt von Griseolutein B gegen Ascites-Tumoren in Mäusen und wenn man eine neuere Publikation (ZEIS et al., 1987) betrachtet, finden sich auch Aktivitäten von Phenazinen auf Enzymebene.

Die in dieser Arbeit untersuchten biologischen Aktivitäten der aus TÜ 2706 isolierten (GEIGER, 1987) und von BAHNMÜLLER (1987) synthetisierten Phenazinderivate gliedern sich in drei Teile:

a. Wirkung auf Mikroorganismen
b. Wirkung auf eine Tumorzellinie
c. Wirkung auf den Nematoden Caenorhabditis elegans

a. Wirkung auf Mikroorganismen

Ausgehend von der Grundstruktur aller untersuchten Phenazinderivate, der Saphensäure (S 3), konnte in Einklang mit den Arbeiten von TAKAHASHI et al. (1986) für diesen Metaboliten keine antimikrobielle Wirkung festgestellt werden. Durch Veresterung mit tert-Butoxyessigsäure konnten TAKAHASHI et al. einen Metaboliten synthetisieren, der eine gute Aktivität gegen Gram-positive und eine schwache Aktivität gegen Gram-negative Bakterien zeigte.

Von allen getesteten Ester der Saphensäure zeigten die, mit einem Aromaten veresterten Metabolite, die beste Wirkung gegen Mikroorganismen. Diese Wirkung beschränkte sich vor allem auf Gram-positive Testkeime, wobei die sehr gute Aktivität (MHK-Werte unter 0,001 µg/ml) nahezu aller Metabolite gegen Xanthomonas campestris (= phytopathogener Erreger) zu erwähnen wäre und weiter untersucht werden sollte.
Die Wirkung der Phenazinderivate scheint von der Substitution an den veresterten Aromaten abzuhängen. Der unsubstituierte Aromat (SS 4 Benzoat) ist nahezu unwirksam, während der in Position 6 methylierte Aromat (SS 4 Toluylat) eine sehr gute Wirkung zeigt. Auch die Bromierung in para-Stellung (SS 4 p-Brom-Benzoat) bringt eine Verbesserung der Aktivität. Die mit Abstand besten antimikrobiellen Aktivitäten, bezüglich MHK-Werte und Wirkungsbreite, zeigen die beiden Metabolite Saphenamycin (S 6) und SS 4 Salicylat, die sich nur in der Methylgruppe in Position 6 unterscheiden. Saphenamycin war auch von allen aus TÜ 2706 isolierten Metaboliten die einzige Substanz, die im Plattendiffusionstest eine antimikrobielle Wirkung zeigte. Bei einem Vergleich der berechneten MHK-Werte mit den von KITAHARA et al. (1982) publizierten Daten, konnten für Bacillus subtilis ähnliche, für Bacillus cereus und Proteus vulgaris deutlich niedrigere MHK-Werte erreicht werden. Für einen aussagekräftigen Vergleich müßten beide Tests jedoch unter exakt gleichen Bedingungen durchgeführt und ausgewertet werden.

Um eindeutige Aussagen über den Einfluß der Substitutionen am veresterten Aromaten und die damit zusammenhängenden Aktivitätsänderungen machen zu können, müßten systematisch alle möglichen Substitutionen mit Hydroxy- und Methylgruppen durchgeführt werden. Mit Hilfe der Free-Wilson-Analyse bei KUBINYI (1986) können solche Versuche geplant und mathematisch ausgewertet werden. Hierbei handelt es sich um eine in der pharmazeutisch-chemischen Industrie verbreitete Methode, mit der Wirkstoffe gezielt verändert werden sollen (KUBINYI, 1987).

Mit dem durchgeführten Wirkungsspektrum konnte deutlich gezeigt werden, daß nach der Veresterung der Carbonsäure am Phenazin-

grundkörper (SS 4 Toluylat-Ethylester) die antimikrobielle Wirkung vollständig verschwunden war. Mit der Ausbildung eines Ethers an der Hydroxygruppe des Aromaten (SS 4 6-Methylsaliyclsäure Methylether A, Saphenamycinmethylether) ging eine starke Verringerung der Aktivität einher.
Bei den untersuchten Ester mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge konnte eine Abnahme der Aktivität, mit steigender Kettenlänge, festgestellt werden.

Ein Test im Biophotometer sollten mögliche Diffusionsprobleme (durch Molekülgröße oder Lipophilie) bei der Wirkung der Phenazine ausschließen.
Die für die Metabolite S 7, S 11 und ES-B gefundene bakterizide und für S 3 nachgewiesene bakteriostatische Wirkung gegen Bacillus cereus deutet auf solche Diffusionsprobleme hin. Für die synthetisierten Phenazine gilt Ähnliches. Die Molekülgröße und die Lipophilie scheinen also für die Wirkung der Phenazine wichtig zu sein.

Bei der Untersuchung des Wirkungsmechanismus von Phenazinen beschrieben LESLEY und BEHKI (1967) für Myxin einen Einfluß auf die Synthese der DNA, gefolgt von Auswirkungen auf RNA- und Proteinsynthese. Wahrscheinlich interkaliert der Phenazingrundkörper in die DNA und führt somit zu Ablesefehlern bei der Transcription. Ähnliches wäre auch für die Wirkung der Ester der Saphensäure denkbar.

b. Wirkung gegen eine Tumorzellinie

KITAHARA et al. (1982) konnten für Saphenamycin eine Aktivität gegen Maus-Leukaemiezellen feststellen und berechneten einen ID_{50}-Wert von 0,15 µg/ml für eine L5178Y-Zellinie und zwischen 0,6-2,5 µg/ml für die L1210-Zellinie.
Als Testzellinie wurde in der vorliegenden Arbeit eine CCRF/CEM-Zellinie eingesetzt, die aus dem peripheren Blut einer Patientin mit aktuter lymphatischer Leukaemie (ALL) isoliert werden konnte.

Es wurden bewußt menschliche Zellen gewählt, denn tierische Tumoren verhalten sich häufig anders als solche menschlichen Ursprungs (DIDDENS, 1986). Hinsichtlich der Suche nach neuen Wirkstoffen gegen menschliche Tumoren und einer späteren Anwendung schien dieser Testansatz besser geeignet.
Bei den aus TÜ 2706 isolierten Phenazinen konnte für ES-B ein ID_{50}-Wert bestimmt werden, der mit 0,6 µg/ml im Bereich des Saphenamycins gegen Maus-Leukaemiezellen lag. Saphenamycin war in seiner Wirkung (ID_{50}= 0,6 µg/ml) geringfügig schlechter und Phenazin konnte mit seinem ID_{50}-Wert von >20 µg/ml, zusammen mit allen anderen isolierten Derivaten, als cytostatisch unwirksam angesehen werden.
Für die verschiedenen synthetisierten Saphensäureester gilt Ähnliches, wie beim Wirkungstest mit Mikroorganismen. Die cytostische Wirkung der untersuchten Phenazine scheint von der veresterten Seitengruppe abhängig zu sein.

Der Wirkmechanismus von Phenazinen gegen Tumorzellinien wurde bislang noch wenig untersucht, doch finden sich bei REWCASTLE et al. (1987) Hinweise, daß Phenazine in die DNA interkalieren und so auf dieser Ebene wirken. Möglicherweise sind die verschiedenen Substitutionen oder Ester des Phenazins und der Saphensäure nur für den Transport durch die Zellmembran in die Zellen notwendig.
Für die cytostatische Wirkung selbst scheint die veresterte Seitengruppe nicht sehr wichtig zu sein, denn die Arbeit von TAKAHASHI et al. (1986) zeigt, daß die Saphensäure (oder DC-86-Y) noch nicht aktiv ist, während der Ester mit einer tert-Butoxyessigsäure eine schwache Aktivität aufweist. Vergleichbare Ergebnisse konnten mit Saphenamycin und S 3 Acetat gemacht werden. Möglicherweise entscheidet die Seitenkette, welche Substanzen in die Zellen eindringen können. Im Zellinnern müßten dann Esterasen aktiv werden und den eigentlichen Phenazinkörper vom `Transportteil´ abtrennen.

MAMBER et al. (1987) beschrieben einen vom Prinzip her gleichen, in der Wirkung aber umgekehrten Mechanismus für Acetomycin. Sie konnten zeigen, daß das in vitro aktive `und in vivo vollständig

inaktive Acetomycin unter dem Einfluß von Esterasen gespalten und somit gegen Tumorzellen unwirksam wird.

Ein endgültiger Beweis obiger Hypothese könnte mit Hilfe ^{14}C-markierter Phenazinderivate geführt werden. Diese Metabolite müßten an verschiedenen Stellen (Phenazingrundkörper und veresterte Seitenkette) markiert sein. Über die Variation der Markierungen, an cytostatisch aktiven und inaktiven Phenazinderivaten, könnten der Wirkort, die Beteiligung der Seitenketten und das Vorhandensein einer Esterase nachgewiesen werden.
Möglichkeiten zur gezielten Synthese und Markierung mit ^{14}C sind mit der Arbeit von BAHNMÜLLER (1987) geschaffen.

c. Wirkung gegen Caenorhabditis elegans

Caenorhabditis elegans gehört zu der Gruppe der Nematoden oder Rundwürmer. Nematoden sind nahezu ubiquitär und finden sich im Erdboden, im Süßwasser, im Meer und als Parasiten in anderen Organismen, Pflanzen wie Tiere (DÖNGES, 1980). C. elegans lebt nicht parasitär und gilt seit den Arbeiten von BRENNER (1974) als Modellorganismus für entwicklungsbiologische Untersuchungen (SCHIERENBERG & CASSADA, 1986).
Mit den gefundenen Wirkungen von Metaboliten auf C. elegans sollen verschiedene Aussagen gemacht werden:
1. Sind die Substanzen toxisch und töten C. elegans ab, oder hemmen ihn in seiner Entwicklung, hat man möglicherweise auch aktive Metabolite gegen verwandte Nematoden wie z.B. Ancylostoma duodenale (Erreger der Hakenwurmseuche) oder Enterobius vermicularis (Madenwurm des Menschen). Diese Nematoden sind Parasiten und müssen zum Teil intensiv bekämpft werden. Mit dem Test sollen also Nematoden-aktive Substanzen gesucht werden.

2. Nach SCHIERENBERG und CASSADA (1986) sollen durch den Einfluß der getesteten Metabolite Aussagen über Entwicklungsvorgänge am intakten Organismus gemacht werden, die dann letzlich im Verständ-

nis zellulärer oder molekularer Vorgänge enden sollen. Allerdings stehen diese Arbeiten erst am Anfang.

Die Auswertung dieses Tests gestaltet sich sehr schwierig, da objektive Bewertungkriterien bislang weitgehend fehlen und der Test noch nicht voll entwickelt ist.
Es kann jedoch festgestellt werden, daß die Mehrzahl der getesteten Phenazine auf C. elegans eine Wirkung ausübt. Diese Wirkung (Reduzierung der Beweglichkeit und Vitalität) sollte mit der anzustrebenden Verfeinerung und objektiveren Auswertung des Tests weiter verfolgt werden. Ein Test mit parasitären Nematoden könnte bei einigen Phenazinen (z.B. S 6) zum Erfolg führen.

5. Betrachtung verschiedener Metabolite aus TÜ 2706

Von den in der Einleitung in Abbildung 1 aufgelisteten Metaboliten wurden von den Phenazinderivaten im Laufe der Arbeit nur die Substanzen S 2, S 3, S 6 und Esmeraldin B intensiv untersucht. Alle anderen Phenazinderivate wurden von TÜ 2706 produziert, konnten aber erst nach einigen Konzentrierungsschritten detektiert werden. Da es sich hierbei jedoch um Derivate der Saphensäure handelt, genügte bei den Untersuchungen am Stoffwechsel von TÜ 2706 die quantitative Detektion der oben angeführten vier Phenazinderivate.

Der Metabolit S 8 ist identisch mit Genistein, das häufig bei Fermentationen mit Sojamehl isoliert werden kann. Da die Detektion im HPLC möglich ist, kann bei weiteren Arbeiten das beschriebene HPLC-System für die schnelle Identifizierung dieses bekannten Metaboliten nützlich sein.

6. Ausblicke

Die von TÜ 2706 produzierten Phenazinderivate bieten als Ester der Saphensäure vielfältige Möglichkeiten zu weiteren Modifkationen. Ein denkbarer Ansatzpunkt zu anschließenden Arbeiten wären zum

Beispiel biologische Modifikationen durch gerichtete Fermentation, wie sie von BLANK (1987) an Bafilomycinen durchgeführt wurden. Möglicherweise könnten durch Modifikationen weitere interessante biologische Aktivitäten gefunden werden. Denkbar wären Wirkungen auf Enzymebene, wie etwa durch die beschriebenen Phenaceine (BUSH et al. (1984) und LIU et al. (1984)), die als ACE-Inhibitoren bei der Regulation des Bludrucks einsetzbar sind.

Eine intensivere Untersuchung der gefundenen cytostatischen Aktivität wäre auch anzustreben, denn trotz der relativ hohen ID_{50}-Werte von Esmeraldin B und Saphenamycin könnten diese Metabolite bei der Behandlung von akuter lymphatischer Leukaemie interessant werden. So findet man in der Tumortherapie mit Bleomycin ein Cytostatikum, das vergleichbar hohe ID_{50}-Werte aufweist (DIDDENS, 1987). Bleomycin wirkt jedoch spezifisch auf bestimmte Tumorarten und wird dadurch für die Therapie interessant. Für die verschiedenen Phenazine sollten deshalb weitere Tumorzellinien und die Toxizität getestet werden.

Für das Verständnis des Wirkmechanismus wären Versuche mit radioaktiv markierten Phenazinen interessant.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Streptomyces antibioticus (TÜ 2706) wurden Versuche zur Detektion, Fermentation, Isolierung und Wirkungsweise der Esmeraldine und anderen Phenazinen durchgeführt.

Aus dem Mycelextrakt konnten 9 verschiedene Phenazinderivate isoliert werden, von denen fünf als neu angesehen werden können. Für Esmeraldin A und B konnte eine für Phenazine neuartige Grundstruktur nachgewiesen werden. Mit acht verschiedenen Fettsäureresten zeigte Esmeraldin A ein großes Variationsmuster.

Die Detektion nahezu aller isolierter Phenazinderivate war mit einem optimierten HPLC-System möglich. Zusätzlich boten die spezifischen Absorptionsbanden aller Phenazine die Möglichkeit zum Screening nach neuen Phenazinderivaten (mit Hilfe der Photodioden-Array-Technik).

Mit Resting cell Kulturen konnte der Phenazinstoffwechsel des Produzenten untersucht werden. Stimulationen und Hemmungen, die durch die Verfütterung verschiedener Metabolite aus dem Stoffwechselweg für aromatische Aminosäuren erzielt werden konnten, ließen Hinweise auf die Biogenese der Phenazine zu.

Saphenamycin zeigte als einzige Substanz gute Aktivitäten bei allen durchgeführten biologischen Tests. Für Esmeraldin B konnte eine cytostatische Aktivität nachgewiesen werden. Es ergaben sich mögliche Ansatzpunkte für eine weitere Berabeitung.

Mit allen isolierten und synthetisierten Phenazinderivaten konnten Versuche zur Struktur/Wirkungsbeziehung gemacht werden. Aktivitätsunterschiede deuteten daraufhin, daß für die biologische Wirksamkeit der Phenazine der veresterte Rest an der Hydroxygruppe der Saphensäure verantwortlich war. Möglicherweise dient dieser Teil aber nur dem Transport der Metabolite in die Zellen.

VI. LITERATUR

ALVARADO, M.: Persönliche Mitteilung (1987).

ASANO, K., TAKAHASHI, K., TOMITA, F. and I. KAWAMOTO: DC-86-M, a novel antitumor antibiotic. I. Taxonomy of producing organism and fermentation.
J. Antibiot. 39(5), 619-628 (1986).

BAHNMÜLLER, U.: 1. Strukturaufklärung einiger Naturstoffe mit chemischen, spektroskopischen und kristallograpischen Methoden. 2. Synthesen in der Saphensäure-Reihe.
Dissertation, ETH Zürich (1987).

BELL, D.J. & R.J. DAVIES: Cell harvesting of oleaginous yeast by cross flow filtration.
In: Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXIX.
Pp. 1176-1178, John Wiley & Sons, Inc. (1987).

BIGGE, C.F., ELSLAGER, E.F., FRENCH, J.C., GRAHAM, B.D., HOKANSON, G.C., MAMBER, S.W., SMITKA, T.A., TUNAC, J.B. and J.H. WILTON: Antimicrobial and antitumor phenazine carboxaldehydes and derivates.
Eur. Pat. Appl. EP 205339 A1, 17 Dec 1986, 69 pp. Designated States: AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE. (1986).

BLANK, W.: Untersuchungen zur biologischen Modifikation der Bafilomycine.
Dissertation, Universität Tübingen (1987).

BRANDL, M.: Produkte des Sekundärmetabolismus aus Streptomyces antibioticus (TÜ 2706).
Diplomarbeit, Universität Tübingen (1985).

BRENNER, S.: The genetics of caenorhabditis elegans.
Genetics 77, 71-94 (1974).

BUSH, K., HENRY, P.R., SOUSER-WOEHLEKE, M., TREJO, W.H. and D.S. SLUSARCHYK: Phenacein- an angiotensin-converting enzyme inhibitor produced by a streptomycete. I. Taxonomy, fermentation and biological properties.
J. Antibiot. 37(11), 1308-1312 (1984).

BYNG, G.S. & J.M. TURNER: Incorporation of (^{14}C)-shikimate into phenazines and their further metabolism by Pseudomonas phenazinium.
Biochem. J. 164, 139-145 (1977).

CALHOUN, D.H., CARSON, M. and R.A. JENSEN: The branch point metabolite for pyocyanine biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa.
J. Gen. Microbiol. 72, 581-583 (1972).

CHANG, P.C. & A.C. BLACKWOOD: Simultaneous production of three phenazine pigments by Pseudomonas aeruginosa MAC 436.
Can. J. Microbiol. 15, 439-444 (1969).

CRANE, L.J., ZIEF, M. and J. HORVATH: Low pressure preparative liquid chromatography.
Reprinted from American Laboratory (May 1981).

CRUEGER, W. & A. CRUEGER: Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie.
Akad. Verlagsgesellschaft, Wiesbaden (1982).

DELZER, J.: Mutasynthese und gerichtete Fermentation in der Nikkomycinreihe.
Dissertation, Universität Tübingen (1983).

DEMAIN, A.L. & Y.M. KENNEL: Resting cell studies on carbonsource regulation of ß-lactam biosynthesis.
J. Ferment. Technol. 56, 323-328 (1978).

DIDDENS, H.: Persönliche Mitteilung (1986).

DIDDENS, H.: Persönliche Mitteilung (1987).

DÖNGES, J.: Parasitologie. Mit besonderer Berücksichtigung humanpathogener Formen.
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1980).

FAWCETT, J.K. & J.E. SCOTT: A rapid method for the determination of urea.
J. Clin. Path. 13, 156-159 (1960).

FIEDLER, H.-P.: Screening for new microbial products by high-performance liquid chromatography using a photodiode array detector.
J. Chromat. 316, 487-494 (1984).

FRITSCHE, W.: Der Einfluß der Kohlenstoff-Quelle auf Wachstumsrate, Proteingehalt und Enzymmuster von Candida guilliermondii.
Z. Allg. Mikrobiol. 8, 91-99 (1968).

GEIGER, A.: Persönliche Mitteilung (1985).

GEIGER, A.: In Vorbereitung.
Dissertation, ETH Zürich (1987).

GEIGER, A. & W. KELLER-SCHIERLEIN: Persönliche Mitteilung (1987).

GERBER, N.N.: Phenazines and phenoxazinones from some novel Nocardiaceae.
Biochemistry 5(12), 3824-3829 (1966).

GERBER, N.N.: New microbial phenazines.
J. Heterocycl. Chem. 6, 297-300 (1969).

GERBER, N.N.: Microbial phenazines.
In: Handbook of Microbiology, Vol. III. Pp. 329-332, Microbial Products.
Eds.: Laskin/Lechavalier, CRC Press (1973).

GÖRISCH, H. & F. LINGENS: 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthetase of Streptomyces aureofaciens TÜ 24.
Biophys. Acta 242, 630-636 (1971).

GRABOSCH, M.: Cross-Flow-Filtration in der Biotechnik.
BioEngineering 1, 62-68 (1987).

GROSSOWICZ, N., HAYAT, P. and Y. S. HALPERN: Pyocyanine biosynthesis by Pseudomonas aeruginosa.
J. Gen. Microbiol. 16, 576-583 (1957).

GURUSIDDAIAH, S., JOIS, Y.H.R., WELLER, D.M., and R.J. COOK: Phenazine antibiotic from Pseudomonas fluorescens.
U.S. Pat. Appl. US 817374 AO, 6 Jun 1986, 33 pp. Avail. NTIS Order No. PAT-APPL-6-817374. (1986).

HAGINO, H. & K. NAKAYAMA: The biosynthetic control in aromatic amino acid producing mutants of Corynebacterium glutamicum.
Agr. Biol. Chem. 39(2), 351-361 (1975).

HÄSLER, P.: Streptonolide. Sekundärmetabolite aus Streptomyces olivaceus (TÜ 2108).
Dissertation, Universität Tübingen (1987).

HERBERT, R.B., HOLLIMAN, F.G. and J.B. SHERIDAN: Biosynthesis of iodinin: incorporation of D-(1-^{14}C)-, D-(6-^{14}C)- and D-(1,6,7-$^{14}C_3$)-shikimic acid.
Tetrahedron Letters 48, 4201-4204 (1974).

HOLLSTEIN, U. & L.G. MARSHALL: Biosynthesis of phenazines.
J. Org. Chem. 37(22), 3510-3514 (1972).

HOOPWOOD, D.A., BIBB, M.J., CHATER, K.F., KIESER, T., BRUTON, C.J KIESER, H.M., LYDIATE, D.J., SMITH, C.P., WARD, J.M. and H. SCHREMPF: Genetic manipulation of Streptomyces. A laboratory manual. (1985).

HUHN, W.: Maduraferrin, ein neuer Siderophor aus Actinomadura madurae. Screening, Isolierung und Fermentation.
Dissertation, Universität Tübingen (1986).

HÜTTER, R., KELLER-SCHIERLEIN, W., NÜESCH, J. und H. ZÄHNER: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 48. Mitteilung. Scopamycine.
Arch. Microbiol. 51, 1-8 (1965).

HÜTTER, R.: Systematik der Streptomyceten.
Karger Verlag, Basel (1967).

INGLEDEW, W.M. & J.J.R. CAMPBELL: Evaluation of shikimic acid as precursor of pyocyanine.
Can. J. Microbiol. 15, 535-541 (1969).

INGRAM, J.M. & A.C. BLACKWOOD: Microbial production of phenazines.
Adv. Appl. Microbiol. 13, 267-282 (1970).

KARNETOVA, J., TAX, J. STAJNER, K., VANEK, Z. and V. KRUMPHANZL: Production of phenazines by Streptomyces cinnamonensis.
Folia Microbiol. (Prague) 28(1), 51-53 (1983).

KELLER-SCHIERLEIN, W.: Persönliche Mitteilung (1987).

KITAHARA, M., NAKAMURA, H., MATSUDA, Y., HAMADA, M., NAGANAWA, H., MAEDA, K. and Y. UMEZAWA: Saphenamycin, a novel antibiotic from a strain of streptomyces.
J. Antibiot. 35, 1412-1414 (1982).

KNIPPERS, R. & M. HOFFMANN-BERLING: A coat protein from bacteriophage fd. I. Hydrodynamic measurements and biological characterization.
J. Mol. Biol. 21, 281-292 (1966).

KUBINYI, H.: Quantitative Beziehungen zwischen chemischer Struktur und biologischer Aktivität.
Chemie in unserer Zeit 6, 191-202 (1986).

KUBINYI, H.: Persönliche Mitteilung (1987).

KURACHI, M.: Studies on the biosynthesis of pyocyanine. VII. On the effect of anthranilic acid (1).
Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ. 37, 85-100 (1959).

KURTH, R.: Untersuchungen zur Regulation der Nikkomycinbildung und Optimierung einer pO_2-Feeding-Fermentation.
Dissertation, Universität Tübingen (1981).

LEISINGER, L. & R. MARGRAFF: Secondary metabolites of the fluorescent Pseudomonads.
Microbiol. Rev. 43, 422-442 (1979).

LESLEY, S.M & R.M. BEHKI: Mode of action of myxin on Escherichia coli.
J. Bacteriol. 94(6), 1837-1845 (1967).

LEVITCH, M.E. & E.R. STADTMAN: A study of the biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid.
Arch. Biochem. Biophys. 106, 194-199 (1964).

LIU, W.C., PARKER, W.L., BRANDT, S.S., ATWAL, K.S. and E.P. RUBY: Phenacein- an angiotensin-converting enzyme inhibitor produced by a streptomycete. II. Isolation, structure determination and synthesis.
J. Antibiot. 37(11), 1313-1319 (1984).

LONGLEY, R.P., HALLIWELL, J.E., CAMPBELL, J.J.R. and W.M. INGLEDEW: The branchpoint of pyocyanine biosynthesis.
Can. J. Microbiol. 18(9), 1357-1363 (1972).

LOWE, D.A. & D.W.S. WESTLAKE: Regulation of chloramphenicol synthesis in Streptomyces sp. 3022a. 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate sythetase.
Can. J. Biochem. 49, 448-455 (1971).

MAC DONALD, J.C.: Pyocyanine.
In: D. Gottlieb and P.D. Shaw (ed.), Antibiotics II. Pp. 52-65. Springer Verlag, Berlin (1967).

MAC DONALD, J.C.: Biosynthesis of pyocyanine.
Can. J. Microbiol. 9, 809-819 (1963).

MALIK, V.S.: Genetics of applied microbiology.
Adv. Genet. 20, 37-126 (1979).

MAMBER, S.W., MITULSKI, J.D., HAMELEHLE, K.L., FRENCH. J.C, HOKANSON, G.C., SHILLIS, J.L., LEOPOLD, W.R., VON HOFF, D.D. and J.B. TUNAC: Biological effects of acetomycin. I. Activity against tumor cells in vitro and in vivo.
J. Antibiot. 40(1), 73-76 (1987).

MARTIN, J.F.: Control of antibiotic synthesis by phosphate.
Adv. Biochem. Eng. 6, 105-127 (1977).

MERCK, E.: Anfärbereagenzien für die Dünnschicht- und Papierchromatographie.
Darmstadt (1980).

MESSENGER, A.J.M. and J.M. TURNER: Phenazine-1,6-dicarboxylate and its dimethyl ester as precursors of other phenazines in bacteria.
FEMS Microbiol. Letters 18, 65-68 (1983).

MILLER, K.M., DEARBORN, D.G. and R.U. SORENSEN: In vitro effect of synthetic pyocyanin on neutrophil superoxide production.
Infect. Immun. 55(3), 559-563 (1987).

MOORE, G.E., GERNER, R.E. and H.A. FRANKLIN: Culture of normal human leucocytes.
J. Am. Med. Assoc. 199, 519-524 (1967).

NAKAMURA, S., MAEDO, K., OSATO, T. and H. UMEZAWA: Structural studies on griseolutein B, phenazine antibiotic.
J. Antibiot. 10(6), 265-266 (1957).

NEUMÜLLER, O.A.: Basis-Römpp. Taschen-Lexikon der Chemie, ihrer Randgebiete und Hilfswissenschaften.
Frankh´sche Verlagshandlung, Stuttgart (1977).

NONOMURA, H.: Key for classification and identification of 458 species on the streptomyces included in ISP.
J. Ferment. Technol. 52, 78-92 (1974).

OCHS, D.: Bildung von Phenylalanin durch Streptomyces tendae Tü 2774.
Diplomarbeit, Universität Tübingen (1987).

OMURA, S.: Macrolide antibiotics.
In: Chemistry, Biology and Practice. P. 410.
Academic Press (1984).

PATEL, M., HEGDE, V., HORAN, A., GULLO, V.P., LOEBENBERG, D., MARQUEZ, J.A., MILLER, G.H., PUAR, M.S. and J.A. WAITZ: A novel phenazine antifungal antibiotic, 1,6-dihydroxy-2-chloro-phenazine.
J. Antibiot. 37(9), 943-948 (1984).

REUSCHENBACH, P.: Studien zur Fermentation der phosphorsäuretriesterhaltigen Lactone aus TÜ 1718.
Dissertation, Universität Tübingen (1986a).

REUSCHENBACH, P.: Pigmente aus dem Streptomyceten Streptomyces aburaviensis var. tuftformis TÜ 1250/5.
Dissertation, Universität Tübingen (1986b).

REWCASTLE, G.W., DENNY, W.A. and B.C. BAGULEY: Potential tumor agents. 51. Synthesis of substituted phenazine-1-carboxamides.
J. Med. Chem. 30(5), 843-851 (1987).

RÖMER, A., BUDZIKIEWICZ, H., KORTH, H. und G. PULVERER: Neue Phenazinderivate aus Pseudomonas aureofaciens.
Tetrahedron Letters 6, 509-512 (1979).

RÖMER, A., SCHOLL, H. und H. BUDZIKIEWICZ: Phenazine aus Pseudomonaden.
Z. Naturforsch. 86b, 1037-1046 (1981).

SANTO, L.: Suche nach Antibiotica mit Wirkungsschwerpunkt Clostridien, Tirandamycin A und B.
Dissertation, Universität Tübingen (1976).

SCHIERENBERG, E. & R. CASSADA: Der Nematode Caenorhabditis elegans- ein entwicklungsbiologischer Modellorganismus.
Biologie in unserer Zeit 16(1) 1-7 (1986).

SCHINDLER, P.: Aktuelle Strategien bei der Suche nach pharmakologisch aktiven Substanzen als Wegweiser einer neuen Ära mikrobieller Sekundär-Metabolite.
BTF-BIOTECH-FORUM 2, 143-149 (1985).

SMITKA, T.A., BUNGE, R.H., WILTON, J.H., HOKANSON, G.C. and J.C. FRENCH: PD 116,152- a new phenazine antitumor antibiotic. Structure and antitumor activity.
J. Antibiot. 39(6), 800-803 (1986).

STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967).

STÜMPFEL, J.: Pyrrolam. Ein Gamma-Lactam aus Streptomyces olivaceus (TÜ 3082). Fermentation, Isolierung und biologische Wirkung.
Dissertation, Universität Tübingen (1987).

SUGIMOTO, S. & J. SHIIO: Enzymes of common pathway for aromatic amino acid biosynthesis in Brevibacterium flavum and its tryptophan-producing mutants.
Agric. Biol. Chem. 49(1), 39-48 (1985).

TAKAHASHI, K., TAKAHASHI, I., MORIMOTO, M. and F. TOMITA: DC-86-M, a novel antitumor antibiotic. II. Structure determination and biological activities.
J. Antibiot. 39(5), 624-628 (1986).

TIPTON, C.D. & K.L. RINEHART: Lomofungin. I. Degradative studies of a new phenazine antibiotic.
J. Amer. Chem. Soc. 92, 1425-1426 (1970).

TUNAC, J.B., MAMBER, S.W., GRAHAM, B.D. and W.E. DOBSON: PD 116, 152. A novel phenazine antitumor antibiotic. Discovery, fermentation, culture characterization and biological activity.
J. Antibiot. 39, 192-197 (1986).

UMEZAWA, H., HAYANO, K., MAEDA, Y., OGATA, Y. & Y. OKAMI: A new antibiotic, griseolutein, produced by Streptomyces.
Jap. Med. J. 3(2), 111-117 (1950).

UMEZAWA, H., TAKEUCHI, T., HAMADA, M. and I. TOSHIHIKO: Microbial production of phenazine derivatives inhibiting phosphodiesterase.
Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 55/3733 (80/3733), 11 Jan 1980, 11 pp. (1980).

WAKSMAN, S.A. & H.B. WOODRUFF: Actinomyces antibioticus, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria.
Gen. Bacteriol. 42, 231-249 (1941).

WALZ, F.: Studien zur Fermentation neuer Nikkomycine mit freien und immobilisierten Zellen.
Dissertation, Universität Tübingen (1986).

WREDE, F. & E. STRACK: Über das Pyocyanin, den blauen Farbstoff des Bacillus pyocyaneus. IV. Die Konstitution und Synthese des Pyocyanins.
Hoppe-Séylers´s Z.physiol.Chem. 181, 58 (1929).

YAGISHITA, K.: Production of phenazine compounds by Streptomyces griseoluteus.
J. Antibiot. Ser. A 13(2), 83-96 (1960).

ZÄHNER, H.: Einige Aspekte der Antibiotika-Forschung.
Angew. Chem. 89, 696-703 (1977).

ZÄHNER, H.: Mikrobieller Sekundärstoffwechsel.
In: Handbuch der Biotechnologie. Eds.: Präve, P., Faust, U., Sittig, W. und D.A. Sukatsch.
Akadem. Verlagsgesellschaft, Wiesbaden (1982).

ZÄHNER, H. & W.K. MAAS: Biology of antibiotics.
Springer Verlag, Berlin (1972).

ZÄHNER, H., DRAUTZ, H. and W. WEBER: Novel approaches to metabolite screening. In: Bioactive microbial products: BU´LOOK, NISBET, WINSTANLEY (Eds.), London, New York: Academic Press (1982).

ZEIS, B.M., ANDERSON, R. and J.F. O´SULLIVAN: Prooxidative activities of 10 phenazine derivates relative to that of clofazimine.
Antimicrob. Agents and Chemother. 31(5), 789-793 (1987).

Lebenslauf

11.08.1959	geboren in Oberndorf/Neckar
1966-1968	Grundschule in Oberndorf/Neckar
1968-1969	Grundschule in Dornhan/Weiden
1969-1970	Hauptschule in Dornhan
1970-1979	Albeck-Gymnasium in Sulz/Neckar
19.07.1979	Abitur
ab WS 1979	Studium an der Universität Tübingen Studienfach: Biologie/Diplom
20.10.1981	Diplom-Vorprüfung in Biologie
01.09.1984- 10.07.1985	Diplomarbeit am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Arbeitskreis Prof. Dr. H. Zähner. Thema: Produkte des Sekundärmetabolismus aus Streptomyces antibioticus (TÜ 2706).
10.07.1985	Diplomhauptprüfung in Biologie anschließend Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner.
ab 01.12.1986	Wissenschaftlicher Angestellter am obigen Lehrstuhl.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, C.-F. Bardele, W. Bessler, V. Braun, D. Bunke, W. Engels, H. Frank, K.H. Gaukler, J. Guglielmi, K.G. Hantke, V. Hemleben, J.V. Höltje, C. Jönsson, G. Jung, W. Löffler, D. Mecke, H. Netzel, F. Oberwinkler, K. Poralla, A. Rieker, E. Sander, B. Schwemmle, H.U. Seitz, W. Seyffert, J. Strähle, M.P. Wenk, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Wolf, H. Zähner.